Aus dem Zentralinstitut für Anaesthesiologie und
Transfusionswesen der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. R. Schorer

DER EINFLUSS VERSCHIEDENER ANAESTHETIKA (HALOTHAN, BUPIVACAIN, KETANEST®) AUF DIE HUMORALE PRIMÄRE IMMUNANTWORT VON BALB/C-MÄUSEN BEI GLEICHZEITIGER IMMUNISIERUNG

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
WILFRIED FREY
aus Öschingen

1983

Aus dem Zentralinstitut für Anaesthesiologie und
Transfusionswesen der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. R. Schorer

DER EINFLUSS VERSCHIEDENER ANAESTHETIKA (HALOTHAN, BUPIVACAIN, KETANEST®) AUF DIE HUMORALE PRIMÄRE IMMUNANTWORT VON BALB/C-MÄUSEN BEI GLEICHZEITIGER IMMUNISIERUNG

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
WILFRIED FREY
aus Öschingen

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

DEKAN:	PROFESSOR DR. W. FROMMHOLD
1. BERICHTERSTATTER:	PROFESSOR DR. R. SCHORER
2. BERICHTERSTATTER:	PROFESSOR DR. R. BÄHR

Herrn Professor Dr. R. Schorer danke ich für die Vergabe des vorliegenden Themas und die großzügige Unterstützung der Arbeit.
Herrn Dr. K.F. Baur gilt mein besonderer Dank für seine freundliche Anleitung, ohne welche die vorliegende Arbeit nicht so hätte durchgeführt werden können.
Für seine hilfreichen Ratschläge bei der Ausführung des Jerne-Plaque-Tests möchte ich Herrn Dr. M. Wabl vom Max-Planck-Institut für Biologie danken.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	DAS BIOLOGISCHE ABWEHRSYSTEM DES MENSCHEN - EINE KURZE ÜBERSICHT	3
2.1.	Definition	3
2.2.	Das unspezifische Abwehrsystem	3
2.2.1.	Die unspezifische Phagozytose	3
2.2.2.	Die Entzündungsreaktion	4
2.2.3.	Die unspezifisch aktivierte Komplementlyse	5
2.2.4.	Die Virostase durch Interferon	5
2.2.5.	Die Abwehr von Mikroorganismen auf der äußeren Körperoberfläche	5
2.3.	Das Immunsystem (spezifische Abwehr)	6
2.3.1.	Antigene	6
2.3.2.	Antikörper	6
2.3.3.	Die Antigen-Antikörper-Reaktion	7
2.3.4.	Die Eliminierung des Antigen-Antikörper-Komplexes	8
2.3.5.	Humorale und zelluläre Immunantwort	8
2.3.6.	Die T-Lymphozyten - Träger der zellulären Immunantwort	9
2.3.7.	Die B-Lymphozyten - Träger der humoralen Immunantwort	11
2.3.8.	Wechselwirkungen zwischen zellulärem und humoralem Immunsystem	11
2.3.9.	Bedeutung der Makrophagen für das Immunsystem	12
2.3.10.	Immunität	12
2.3.11.	Bestimmung der immunologischen Kompetenz	13
2.3.12.	Das Prinzip des Jerne-Plaque-Tests	13
3.	FRAGESTELLUNG DER VORLIEGENDEN ARBEIT	16

		Seite
4.	MATERIALIEN UND METHODEN	18
4.1.	Materialien	18
4.1.1.	Versuchstiere	18
4.1.2.	Chemikalien	18
4.1.3.	Geräte	18
4.2.	Methoden	19
4.2.1.	Modifikation des Jerne-Plaque-Tests nach Cunningham	19
4.2.2.	Bestimmung der günstigsten Konzentration des Helferserums	20
4.2.3.	Immunisierung	20
4.2.4.	Splenektomie und Gewinnung einer Milzzellsuspension	21
4.2.5.	Auszählung der lebenden Milzzellen	21
4.2.6.	Anästhesiemethoden	21
4.2.6.1.	Halothan-Narkose	21
4.2.6.2.	Ketanest®-Anästhesie	22
4.2.6.3.	Bupivacain-Anästhesie	23
4.2.7.	Vorversuch zur Erprobung des Verfahrens und zur Bestimmung der Meßtage	24
4.2.8.	Vorversuch zum Nachweis eventueller Einflüsse der Atropinprämedikation und/oder der Begasung mit 100 % O_2 während der Halothannarkose	25
4.2.9.	Hauptversuch zum Vergleich der Wirkungen von Halothan, Bupivacain und Ketanest® auf die humorale Primärantwort von Balb/c-Mäusen	25
4.2.10.	Hauptversuch mit direktem Vergleich der Wirkungen von Halothan und Ketanest® auf die humorale Immunantwort von Balb/c-Mäusen	26
4.2.11.	Statistische Auswertung	26
5.	ERGEBNISSE	27
5.1.	Die günstigste Konzentration des Helferserums	27
5.2.	Die normale humorale Primärantwort von Balb/c-Mäusen	28

Seite

5.3. Einflüsse der Prämedikation mit Atropin und der Begasung mit 100 % O_2 31

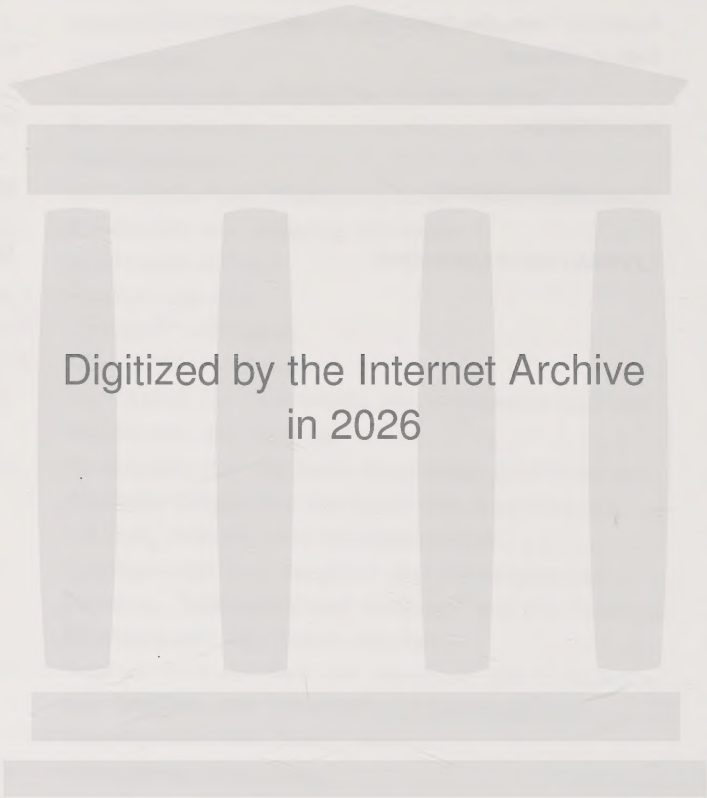
5.4. Vergleich der Wirkungen von Halothan, Ketanest® und Bupivacain auf die humorale Primärantwort von Balb/c-Mäusen 34

5.5. Direkter Vergleich der Wirkungen von Halothan und Ketanest® auf die humorale Primärantwort von Balb/c-Mäusen 41

6. DISKUSSION 44

7. ZUSAMMENFASSUNG 47

8. LITERATURVERZEICHNIS 48


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547603_0045

1. EINLEITUNG

Trotz großer Fortschritte der operativen Disziplinen und der Anaesthesiologie wird der Therapieerfolg auch heute noch häufig durch komplizierende Infektionen oder beschleunigtes postoperatives Tumorwachstum infrage gestellt (1). Neue Erkenntnisse auf dem Gebiet der Immunologie waren Anlaß für eine Vielzahl von Versuchen über Wechselwirkungen zwischen Anaesthesie und Operation einerseits und Immunsystem andererseits. Diese ergaben eine Reihe von Hinweisen, die gewisse ungünstige immunsuppressive Effekte als möglich aufzeigen (2).

GRAHAM (3) berichtete bereits 1911 über eine reversible, dosisabhängige Beeinträchtigung der Phagozytosefähigkeit nach Äthernarkose. Ähnliche Versuche mit Halothan und N_2O durch CULLEN (4) ergaben nur geringe Effekte auf die Phagozytoseaktivität menschlicher Leukozyten.

1956 konnten LASSEN (5) und Mitarbeiter negative Einflüsse auf das hämatopoetische System nach Langzeittherapie mit Lachgas nachweisen. Sie fanden Granulozytopenien, Thrombozytopenien sowie ausgeprägte Anämien.

BRUCE (6) und CULLEN (7) zeigten eine verminderte Proliferation kultivierter menschlicher T-Lymphozyten auf PHA (= Phytohämagglutinin) nach Begasung mit Halothan. Mit Hilfe radioaktiv markierten Thymidins wiesen sie eine dosisabhängige Verminderung der DNA-Synthese als Ausdruck der beeinträchtigten Proliferationsaktivität der Lymphozyten nach. Dieser Nachweis ist jedoch nicht streng spezifisch für Lymphozyten.

NUNN und Mitarbeiter (8, 9) fanden an Stamm-Knochenmarkszellen der Maus bei in vitro-Experimenten mit Halothan eine dosisabhängige Hemmung des Wachstums. Eine Halothankonzentration von 0,5 % erbrachte eine geringe, eine Konzentration von 2 % eine fast totale Hemmung.

Über Ketamin und Bupivacain ist nur wenig berichtet worden. CULLEN (10) fand im Lymphozytentransformationstest mit PHA nach Ketamin keine statistisch signifikante Suppression bei klinisch relevanten bis submaximalen Dosen.

1979 verglichen STURROCK (11) und NUNN die zytotoxische Wirkung von Lidocain, Procain und Bupivacain. Sie konnten für Bupivacain eine deutlich höhere Zytotoxizität nachweisen. Dieselben Autoren fanden eine Wachstumshemmung von Fibroblasten, wenn dem Nährmedium Procain, Lidocain oder Bupivacain zugesetzt wurde (12). LÖFSTRÖM (13) und SCHILD fanden eine eingeschränkte Funktion des RES nach Periduralanästhesie mit Bupivacain.

Über das Ausmaß des Einflusses der einzelnen Faktoren operatives Trauma, Streß und Anästhesie auf die Immunantwort liegen widersprüchliche Ergebnisse vor. Während ESPANOL (14) bei Kindern nach Einleitung der Anästhesie, aber vor Beginn der Operation eine deutlich reduzierte Lymphozytentransformation fand und dies durch die Anästhesiewirkung erklärte, kamen CULLEN und VAN BELLE (15) zu gegenteiligen Resultaten. Sie nahmen eine Klassifizierung der traumatischen Schweregrade bei operativen Eingriffen vor und konnten eine deutliche Beziehung zwischen postoperativer Suppression der Lymphozytentransformation auf PHA und Grad des Operationstraumas aufzeigen. Sie fanden bei kleinen Eingriffen keinerlei Reduktion der T-Zell-Reaktion auf PHA, während schwere Traumata signifikante Suppressionen bewirkten. Die Autoren machten dafür allein das chirurgische Trauma und psychischen Streß verantwortlich. Streß verursacht einen erhöhten Blutspiegel von Corticoiden und Catecholaminen, beide wirken immunsuppressiv (16, 17, 18).

2. DAS BIOLOGISCHE ABWEHRSYSTEM DES MENSCHEN - EINE KURZE ÜBERSICHT

2.1. Definition

Das menschliche Abwehrsystem ist ein komplex reagierendes System, welches als Gesamtheit aller Reaktions- und Regulationsorgane zur Erhaltung der strengen biologischen Individualität definiert werden kann. Es widersetzt sich allen als fremd erkannten Substanzen, Zellen und Mikroorganismen. Es besteht aus zwei gegeneinander abzugrenzenden Komponenten:

1) Unspezifisches Abwehrsystem
2) Immunsystem.

2.2. Das unspezifische Abwehrsystem (19, 20, 21, 22, 23)

Das unspezifische Abwehrsystem ist genetisch determiniert, also angeboren. Zur unspezifischen Abwehr sind die unspezifische Phagozytose, die Entzündungsreaktion, die unspezifisch aktivierte Komplementlyse, die Virostase durch Interferon und die Abwehr von Mikroorganismen auf der äußeren Körperoberfläche zu zählen.

2.2.1. Die unspezifische Phagozytose

Die unspezifische Phagozytose schützt den Organismus durch Eliminierung von Mikroorganismen und Fremdpartikeln, welche durch einfache, unspezifische Rezeptoren erkannt werden. Diese Aufgabe wird von Phagozyten (s. Tab. 1) geleistet. Die Eliminierung geschieht durch die Anlagerung der Fremdkörper an einen Phagozyten, ihre Aufnahme in die Zelle sowie ihre Abtötung und ihren Abbau innerhalb des Phagozyten.

Phagozyten		
	Zelltyp	Vorkommen
Mikrophagen	neutrophile Granulozyten	Blut u. alle Gewebe
	eosinophile Granulozyten	Blut u. alle Gewebe
Makrophagen	Monozyten	Blut u. alle Gewebe
	phagozytierende Endothelzellen ("Uferzellen)	Lymphknotensinus u. Knochenmarkskapillaren
	Kupffersche Sternzellen	Lebersinus
	Mesogliazellen	Hirnkapillaren

Tab.1: Phagozyten, Zelltypen und Vorkommen

2.2.2. Die Entzündungsreaktion

Die Entzündungsreaktion ist die lokale Reaktion des Gewebes auf verschiedenste Formen der Gewebsverletzung. Sie wird durch vasoaktive und chemotaktische Substanzen (s. Tab. 2) ausgelöst. Die vasoaktiven Substanzen führen zu einer Vasodilatation und erhöhter Kapillarpermeabilität. Darauf gelangen durch den Einfluß der chemotaktisch wirksamen Substanzen Phagozyten aus dem Blut ins Gewebe und können Fremdkörper und Erreger zerstören.

Vasoaktive und chemotaktisch wirksame Substanzen		
Substanz	Vorkommen	Wirkung
Histamin	Mastzellen des pericapillären Bindegewebes granuläre Leukozyten	Vasodilatation Steigerung der Kapillarpermeabilität
Serotonin	Thrombozyten	Steigerung der Kapillarpermeabilität u.a.
Kinine (=kurzkettige Peptide, z.B. Bradikinin, Kallidin)	Plasma	Vasodilatation Steigerung der Kapillarpermeabilität Chemotaxis
Prostaglandine	ubiquitäre Verbreitung	Vasoaktivität Chemotaxis u.a.

Tab.2: Vasoaktive und chemotaktisch wirkende Substanzen, Vorkommen und Wirkung

2.2.3. Die unspezifisch aktivierte Komplementlyse

Das Komplementsystem besteht aus neun im Serum vorhandenen Glykoproteinen, C_1 - C_9. Der Ablauf seiner biologischen Funktion erfordert die gegenseitige Aktivierung der Faktoren im Sinne einer Kettenreaktion (analog der Aktivierung der Blutgerinnungsfaktoren). Eine Aktivierung kann spezifisch (s. Kap. 2.3.3.) oder unspezifisch, d.h. ohne Mitwirkung von Antikörpern erfolgen. Die unspezifische Aktivierung wird durch Polysaccharide und Lipopolysaccharide aus der Bakterienzellwand ausgelöst und beginnt mit der Aktivierung des Plasmaproteins Properdin. Phospholipasen und Proteasen des Komplementsystems führen im Ablauf der Kettenreaktion zu Membrandefekten, die zur Funktionsunfähigkeit der Zelle führen. Die Zelle stirbt ab und wird phagozytiert. Im Verlauf der Komplementaktivierung entstehen frei bewegliche aktive Komponenten (C_{3a}, C_{5a}), welche chemotaktische Wirkung entfalten und so die Emigration von Phagozyten ins Gewebe fördern.

2.2.4. Die Virostase durch Interferon

Interferon ist ein lösliches Protein, dessen Bildung und Freisetzung in vielen tierischen Zellen durch Virusinfektionen induziert wird. Es hemmt die Neubildung sowohl des infizierenden als auch vieler anderer Viren. Von Bedeutung ist dieser Abwehrmechanismus insbesondere bei Virusinfektionen mit kurzer Inkubationszeit, d.h. bei denen nur wenig Zeit für eine primäre Antikörperbildung zur Verfügung steht (z.B. Infektionen durch Influenzaviren), und bei Infektionen, gegen die eine Immunität schwer zu erreichen ist, weil sie durch eine große Zahl antigenetisch unterschiedlicher Viren hervorgerufen werden (z.B. Influenzaviren).

2.2.5. Die Abwehr von Mikroorganismen auf der äußeren Körperoberfläche

Viele Mikroorganismen werden bereits vor ihrem Eindringen in Körperzellen auf der Körperoberfläche abgewehrt oder zerstört. Auf der Haut herrscht ständig ein saures pH durch Milchsäure und Fettsäuren in Schweiß und Talg. Dadurch werden viele Bakterien abgetötet Die Kinozilienaktivität des respiratorischen Systems verhindert das Eindringen eines Großteils eingeatmeter Mikroorganismen. Das Enzym Lysozym, eine Hydrolase, entfaltet bakterizide Wirkung auf gram-positive Bakte-

rien durch Zerstörung der Bakterienzellwand. Es wurde in verschiedenen Körpersekreten wie Speichel, Nasenschleim, Cervikalschleim, Tränenflüssigkeit, Schweiß und Magensaft nachgewiesen.

2.3. Das Immunsystem (spezifische Abwehr) (20, 21, 22, 23, 24, 25, 26)

Eine spezifische Immunantwort wird durch Antigene (s. Kap. 2.3.1.) ausgelöst, während unspezifische Mechanismen auch durch Stoffe in Gang gesetzt werden können, die nicht antigen wirken. Die Aufgaben des menschlichen Immunsystems werden von den Lymphozyten ausgeführt. Sie erkennen Antigene an bestimmten Oberflächenstrukturen (= antigene Determinanten) und regen daraufhin die Bildung von antikörperproduzierenden Plasmazellen oder von Lymphozyten an, die direkt spezifisch gegen das jeweilige Antigen gerichtet sind.

2.3.1. Antigene

Antigene sind körperfremde Makromoleküle, die eine Immunantwort auslösen. Proteine, Glykolipide, Glykoproteine, Polysaccharide und Nucleinsäuren können antigen wirken, z.B. wenn sie die Oberflächenstruktur von Bakterien, Viren oder Tumorzellen bilden. Nicht das gesamte Makromolekül, sondern nur ein Teil der Oberflächenstruktur, die "antigene Determinante", wirkt antigen. Auf einem Makromolekül können mehrere Antigene sitzen.

2.3.2. Antikörper

Bei der Elektrophorese des Serums treten die humoralen Antikörper in der γ-Globulinfraktion auf, was zur Bezeichnung "Immunglobuline" geführt hat. Sie bestehen aus zwei gleichartigen, leichten L-Ketten (L = light) und zwei identischen, schweren H-Ketten (H = heavy), die durch Disulfidbrücken verbunden sind. Beim Menschen sind fünf verschiedene H-Ketten (γ, α, μ, δ, ε) bekannt, wonach die verschiedenen Immunglobuline als IgG, IgA, IgM, IgD, IgE benannt sind.
Am besten untersucht ist die Struktur des IgG-Moleküls. Es handelt sich um einen monomeren Antikörper mit einem Molekulargewicht von ca. 150 000. Er hat die Form eines Y. Die Disulfidbrücken teilen das IgG-Molekül in vier Segmente, mit unterschiedlichen Funktionen: Antigenbindungsstellen, Komplementbindungsstellen und Makrophagenbindungsstelle (s. Fig. 1).

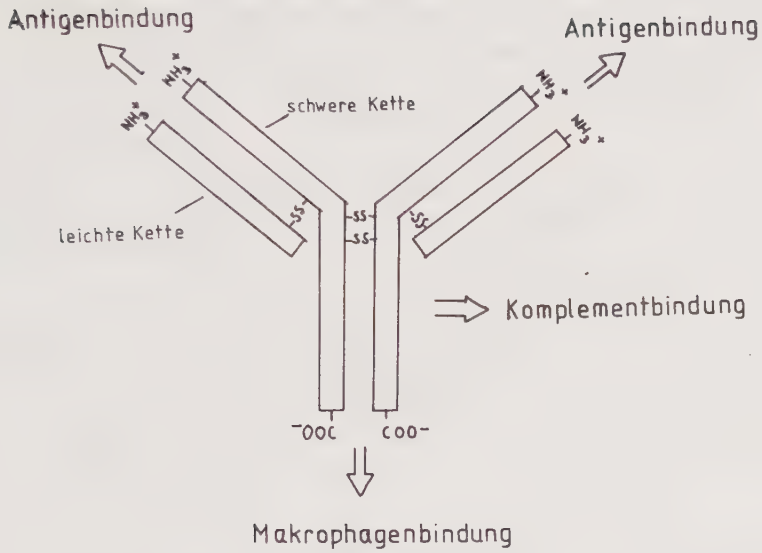


Fig.1: Stuktur eines IgG-Antikörpers

IgM-Antikörper sind Pentamere. Aufgrund ihrer Größe (MG ca. 900 000) sind sie kaum in der Lage, aus dem Blutstrom in die interstitielle Flüssigkeit zu gelangen. IgM ist daher prinzipiell ein Antikörper des Blutes, der besonders am Anfang einer Immunantwort in großer Menge gebildet wird, während mit zunehmender Präsenz des Antigens die IgG-Produktion mehr und mehr überwiegt.
Es konnten Plasmazellklone (Klon = von einer einzelnen Zelle abgeleitete Zellinie) nachgewiesen werden, die zuerst IgM, später aber auch IgG sezernieren. Es findet also eine Umstellung der IgM-Produktion auf IgG-Produktion statt (sog. "switch" der Immunglobulinklassen, 27).

2.3.3. Die Antigen-Antikörper-Reaktion

Die Reaktion zwischen Antigen und Antikörper ist hochspezifisch. Antikörper können zwischen zwei Proteinen unterscheiden, deren Aminosäuresequenz sich in einer einzigen Aminosäure unterscheidet. Die Affinität zwischen Antigen und Antikörper ist um so größer, je genauer

die dreidimensionale Struktur der antigenen Determinante und der Bindungsstelle des Antikörpers sich entsprechen und je komplementärer die Ladungsverteilung auf den Oberflächen ist (s. Fig. 2).

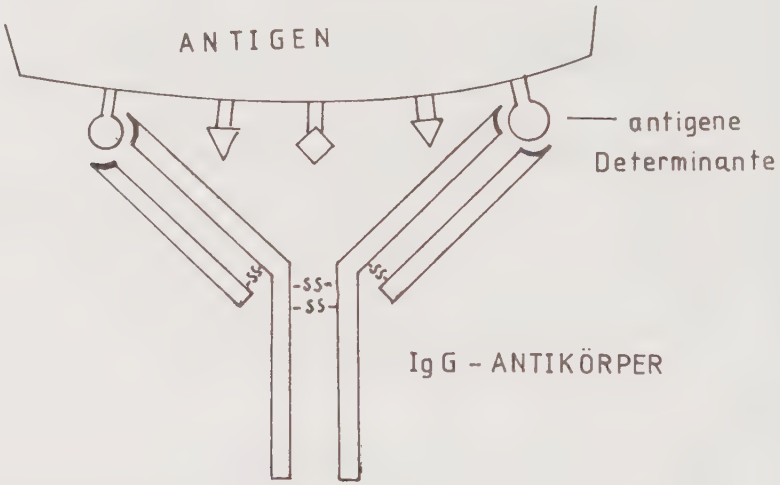


Fig.2: Antigen - Antikörper - Reaktion

2.3.4. Die Eliminierung des Antigen-Antikörper-Komplexes

Die Eliminierung des Antigen-Antikörper-Komplexes und somit des Antigens erfolgt entweder über Phagozytose (s. Kap. 2.3.9.) oder über die Aktivierung des Komplementsystems. Die Aktivierung des Komplementsystems erfolgt durch die Bindung der C_1-Komponente an die Komplementbindungsstelle des Immunglobulins. Dadurch wird die zur Zerstörung der Membran führende Kettenreaktion (s. Kap. 2.2.3.) ausgelöst. Wirkt als Antigen keine Zelle, sondern ein Makromolekül, kommt es durch die Aktivierung des C_3-Faktors zu einer beschleunigten Phagozytose des Antigen-Antikörper-Komplexes, da Makrophagen einen spezifischen Rezeptor für C_3 besitzen.

2.3.5. Humorale und zelluläre Immunantwort (s. Fig. 3)

Man unterscheidet zwei Arten der Immunantwort, eine humorale und eine zelluläre. Beide Systeme reagieren spezifisch auf die meisten Antigene, wobei jedoch generell ein System überwiegt. Das zelluläre Sy-

stem wirkt besonders effektiv gegen Pilze, Parasiten, intrazelluläre Virusinfektionen, Tumorzellen und körperfremde Gewebe (z.B. Transplantate). Das humorale System reagiert besonders auf extrazelluläre bakterielle und virale Infektionen. Träger der beiden Systeme sind die T-Lymphozyten und die B-Lymphozyten, die sich morphologisch nicht unterscheiden.

2.3.6. Die T-Lymphozyten - Träger der zellulären Immunantwort (s. Fig. 3)

Die T-Lymphozyten entwickeln sich aus Stammzellen des Knochenmarks. Nach ihrer immunologischen Prägung im Thymus (T = Thymus) werden sie als immunkompetente T-Lymphozyten bezeichnet. Die Stimulierung durch ein Antigen führt über Proliferation und Differenzierung zu einem Klon von sogenannten T-Effektorzellen. Sie bewirken die eigentliche zelluläre Immunantwort. Es werden verschiedene Typen von T-Effektorzellen unterschieden:

1) T-Killer-Zellen
   Ihre Funktion besteht in der Abtötung körperfremder Zellen (z.B. Zerstörung von Bakterien und Tumorzellen, Transplantatabstoßung). Die Zerstörung kommt durch partiellen Abbau der Zellmembran zustande.
2) T-Helfer-Zellen
   Sie werden als Helferzellen bezeichnet, weil sie zur Proliferation und Differenzierung der B-Zellen zu Plasmazellen (s. Kap. 2.3.8.) erforderlich sind.
3) T-Suppressor-Zellen
   Sie haben eine wichtige Funktion bei der Regulation der humoralen und der zellulären Immunantwort. Sie schützen den Organismus vor einer unkontrollierten Überschwemmung mit Plasmazellen bzw. T-Effektor-Zellen.
4) T-Lymphokin-Zellen
   Die T-Lymphokin-Zellen sind für die Auslösung zellvermittelter Überempfindlichkeitsreaktionen bei bestimmten Personen verantwortlich (Hypersensitivität vom verzögerten Typ, z.B. Tuberculinreaktion).

Bei jeder primären Immunantwort werden außerdem sogenannte T-Memory-Zellen gebildet. Diese "Gedächtniszellen" sorgen bei einem erneuten Auftreten desselben Antigens für eine schneller einsetzende

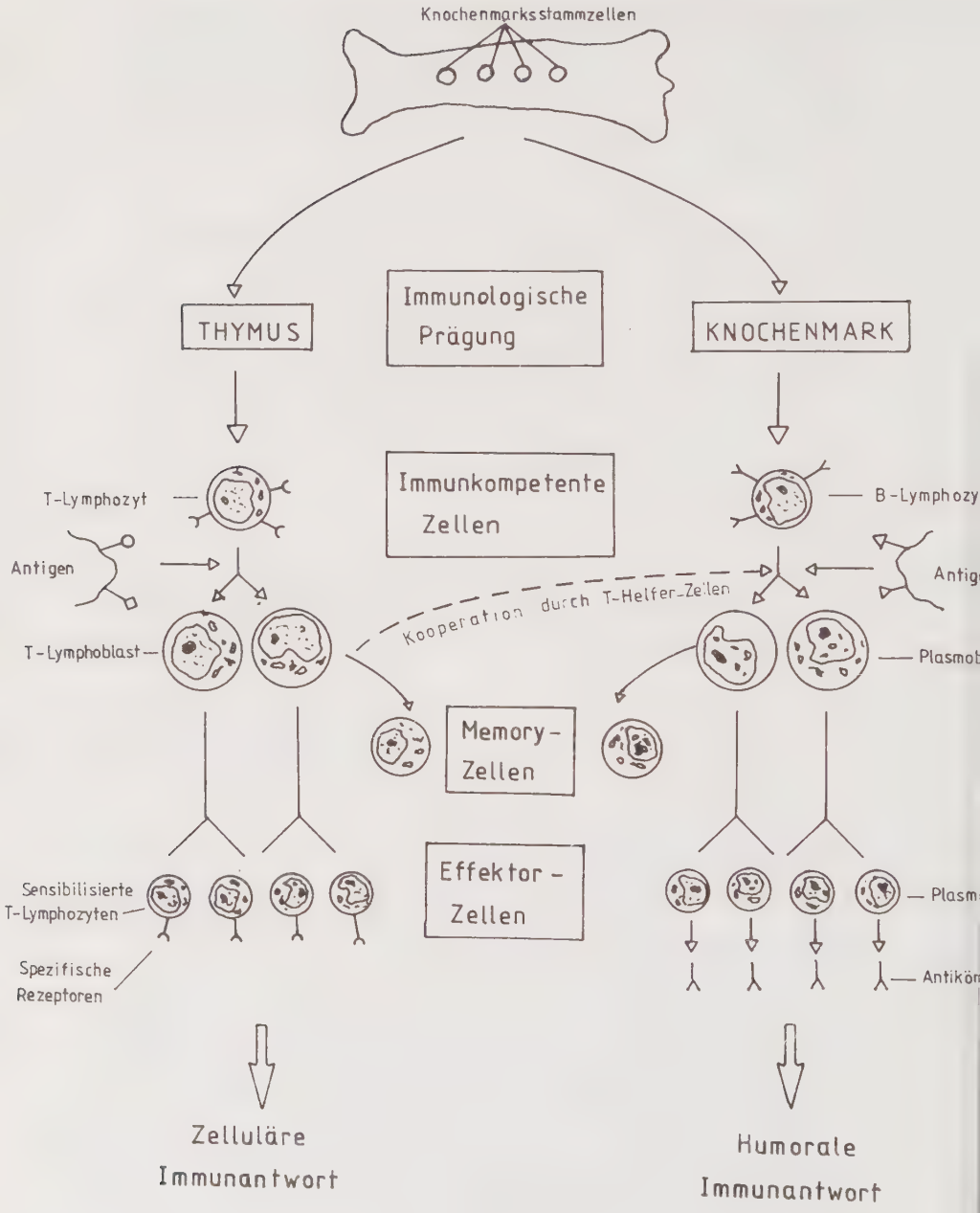


Fig. 3 : Zelluläre und humorale Immunantwort

und heftiger ablaufende zelluläre Immunantwort (sekundäre Immunantwort).

2.3.7. Die B-Lymphozyten - Träger der humoralen Immunantwort (s. Fig. 3)

Auch die B-Lymphozyten stammen von Knochenmarksstammzellen ab. Bei Vögeln konnte erstmals die sogenannte Bursa Fabricii, ein lymphoepitheliales Organ der Kloakenwand, als Ort der immunologischen Prägung nachgewiesen werden, was zur Bezeichnung B-Lymphozyt (B = Bursa) führte. Bei den Säugetieren findet die immunologische Prägung während der Fetalzeit in Milz und Leber, später im Knochenmark statt. Besonders zahlreich kommen B-Zellen in Lymphknoten und in der Milz vor. Der Kontakt mit einem passenden Antigen führt analog zur Entwicklung der T-Lymphozyten über Proliferation und Differenzierung zu einem Klon von Effektorzellen, den sogenannten Plasmazellen. Diese Plasmazellen synthetisieren und sezernieren Antikörper, die spezifisch gegen das auslösende Antigen gerichtet sind (humorale Immunantwort). Auch bei diesem Vorgang werden "Gedächtniszellen", sogenannte B-Memory-Zellen gebildet, die beim Wiederauftreten desselben Antigens eine heftigere und schneller ablaufende sekundäre Immunantwort auslösen. Zuerst bilden die Plasmazellen nur IgM-Antikörper, bleibt das Antigen länger präsent, werden überwiegend IgG-Antikörper gebildet (s. Kap. 2.3.2.).

2.3.8. Wechselwirkungen zwischen zellulärem und humoralem Immunsystem

Während freie Antikörper bei der zellulären Immunantwort keine Rolle spielen, haben die T-Helfer-Zellen eine wichtige Funktion für die humorale Immunantwort. Dies konnte duch neonatale Entfernung des Thymus nachgewiesen werden, welche eine stark verminderte Antikörpersynthese zur Folge hatte. Die Kooperation von B-Zellen und T-Zellen setzt Antigene mit mindestens zwei antigenen Determinanten voraus. Das Antigen wirkt durch die Bindung von B-Zelle und T-Helfer-Zelle als Brücke. Dieser Mechanismus der T-Zellabhängigkeit wurde besonders bei IgG-, IgA- und IgE-Antworten gefunden. Die meisten IgM-Antworten sind T-zellunabhängig. Der Mechanismus der Kooperation zwischen T-Helfer-Zellen und B-Zellen ist noch ungeklärt, es wurden zwei verschiedene

Modelle als mögliche Erklärungen vorgeschlagen. Das erste Modell basiert darauf, daß die T-Helfer-Zelle über eine Antigenbrücke mit der B-Zelle zusammenwirkt. Das zweite Modell geht davon aus, daß eine antigenaktivierte T-Helfer-Zelle lösliche Faktoren sezerniert, welche die Proliferation und Differenzierung einer antigenaktivierten B-Zelle zu Plasmazellen auslösen.

2.3.9. Bedeutung der Makrophagen für das Immunsystem

Die Makrophagen spielen eine wichtige Rolle bei der Antigenerkennung und bei der Eliminierung von Antigen-Antikörper-Komplexen. Das Antigen wird durch Bindung an die Makrophagenoberfläche den B-Lymphozyten in hoher Dichte präsentiert, wodurch die Intensität der Immunantwort erhöht wird. Ähnlich wie für T-Lymphozyten wird auch für Makrophagen die Sekretion löslicher Faktoren diskutiert, welche die Proliferation und Differenzierung von B-Zellen zu Plasma-Zellen auslöst.
Die Eliminierung von Antigen-Antikörper-Komplexen durch Phagozytose erfolgt entweder durch Anlagerung von Makrophagen an unspezifische Rezeptoren des Antigen-Antikörper-Komplexes oder bei Antigenen, die mit IgG besetzt sind, durch die sogenannte spezifische Phagozytose. Dabei lagern sich die Makrophagen an spezifische Rezeptoren für die Makrophagenbindungsstelle von IgG an. Da diese Bindung eine sehr hohe Affinität besitzt, verläuft die Phagozytose im Vergleich zur unspezifischen hier stark beschleunigt. Über einen spezifischen Rezeptor der Makrophagen für den Komplementfaktor C_3 kann ebenfalls eine beschleunigte Phagozytose ausgelöst werden (s. Kap. 2.3.4.).

2.3.10. Immunität

Unter dem Begriff Immunität versteht man eine individuell erworbene spezifische Widerstandsfähigkeit gegen bestimmte Krankheitserreger oder deren Toxine. Immunität wird durch "Gedächtnismechanismen" des Immunsystems bewirkt. Die Träger dieses Gedächtnisses sind die T-Memory-Zellen und die B-Memory-Zellen. Diese sorgen bei einem zweiten Kontakt mit einem bekannten Antigen für die sofortige Bildung von spezifischen Effektorzellen (s. Kap. 2.3.6., 2.3.7.). Im Vergleich zur primären Immunantwort verläuft die Sekundärreaktion wesentlich rascher und heftiger. Bei bestimmten Infektionskrankheiten (z.B. Masern,

Röteln) wird somit eine Eliminierung des Antigens möglich, bevor es zu einer ernsten Infektion kommt. Der Organismus ist gegen das Antigen immun.

2.3.11. Bestimmung der immunologischen Kompetenz

Es gibt viele in vivo- und in vitro-Tests, die Aussagen über das immunologische Reaktionsvermögen erlauben. Aufgrund der hohen biologischen Normbreite ist die Aussagekraft von Einzeltests für den Kliniker jedoch gering. TÖNNESMANN (28) gibt hier eine sehr nützliche Zusammenstellung verschiedener Tests, die nach Zusammenfassung der Einzelparameter eine zuverlässige Einschätzung des "Immunstatus" eines Individuums erlauben. Dabei wird zwischen Untersuchungen unterschieden, die entweder das humorale oder das zelluläre Immunsystem betreffen oder die Ergebnisse über verschiedene Komponenten des Immunsystems liefern.
Unter den Verfahren zur Untersuchung des humoralen Immunsystems nimmt der Plaque-Test nach Jerne eine wichtige Stelle ein. Er wurde auch in der vorliegenden Arbeit verwendet, um die humorale Primärantwort bei Balb/c-Mäusen aufzuzeichnen.

2.3.12. Das Prinzip des Jerne-Plaque-Tests (29, 30, 31, 32)

Der 1963 von JERNE und NORDIN (29) angegebene Test ist ein Standardverfahren zur Ermittlung der Plasmazellaktivität geworden. Er liefert eine quantitative Aussage über die Aktivität des humoralen Immunsystems.
Der Test basiert auf der lysierenden Wirkung des Komplement-Systems auf antikörpertragende Zellen, die an Zelloberflächenantigene gebunden sind. Erythrozyten (meist Schafserythrozyten, da sie eine besonders ausgeprägte Antigenwirkung besitzen), die ein bestimmtes Antigen tragen, werden mit einer B-zellreichen Suspension (Lymphknoten- oder Milzzellsuspensionen) vermischt und in ein Agargel eingebracht. Während der folgenden Inkubation synthetisiert und sezerniert ein Teil der Plasmazellen Antikörper gegen das Antigen der Erythrozytenoberfläche. Zugabe von Komplement verursacht um jede dieser Plasmazellen eine Zone lysierter Erythrozyten. Dieser Lysehof wird als Plaque bezeichnet. Die Anzahl antikörperproduzierender Plasmazellen ist also mit der Anzahl der zu beobachtenden Plaques identisch.

Diese sogenannte direkte Methode weist IgM-bildende Plasmazellen nach, IgG-produzierende Zellen werden jedoch kaum erfaßt. Der Grund liegt darin, daß die Lyse antikörperbesetzter Erythrozyten durch Komplement nur ein einzelnes IgM-Molekül erfordert, jedoch mindestens zwei benachbarte IgG-Moleküle (s. Fig. 4 u. 5). Durch die relativ geringe Anzahl von Antikörpern, die von einer einzelnen Zelle sezerniert werden, ist aber eine unmittelbar benachbarte Anlagerung von Antikörpern selten, besonders dann, wenn die räumliche Anordnung der antigenen Determinanten ungünstig ist.
Mittels der sogenannten indirekten Methode können jedoch auch IgG-produzierende Plasmazellen nachgewiesen werden. Durch Zugabe eines heterologen Antiserums gegen IgG ("Helferserum") kommt es zur Anlagerung von anti-IgG-Antikörpern an jeden an die Erythrozytenoberfläche gebundenen IgG-Antikörper. Dieser Komplex kann durch Komplement lysiert werden und es bilden sich ebenfalls Plaques. Da bei dieser Technik aber sowohl IgM-produzierende als auch IgG-produzierende Plasmazellen enthalten sind, ist es zur Ermittlung der Anzahl IgG-produzierender Zellen nötig, zusätzlich ein direktes Präparat herzustellen. Durch Subtraktion der Plaques des direkten Präparates erhält man die Zahl der IgG-Plaques (s. Fig. 4 u. 5).

Fig. 4: Jerne Plaque-Test, direkte Methode

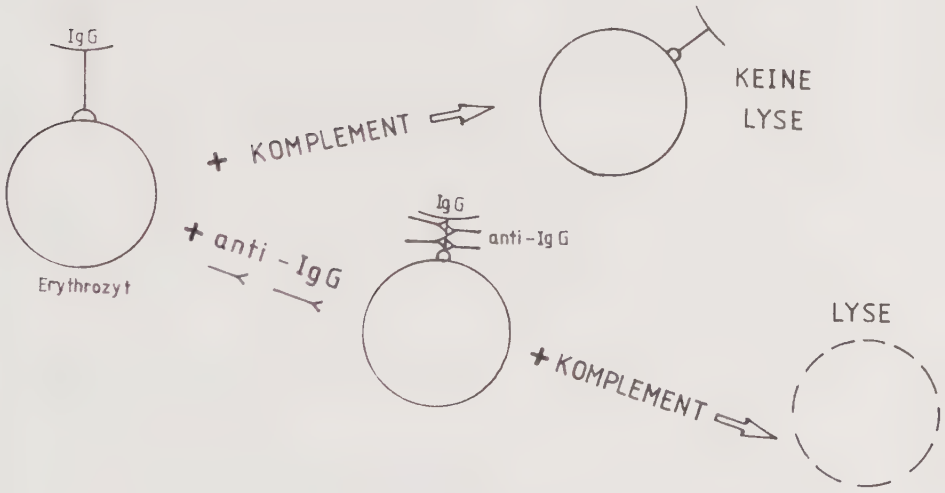


Fig. 5: Jerne Plaque-Test, indirekte Methode

3. FRAGESTELLUNG DER VORLIEGENDEN ARBEIT

Die vorliegende Arbeit soll den Einfluß von Anästhetika unter Ausschluß eines Operationstraumas auf die humorale Primärantwort von Balb/c-Mäusen bei gleichzeitiger Immunisierung untersuchen und somit direkt eine mögliche Immunsuppression nachweisen, wobei prinzipiell alle Faktoren des Immunsystems betroffen sein können. Gleichzeitig sollen durch die Verwendung verschiedener Anästhetika, wobei jeweils ein typisches Agens unterschiedlicher Analgesieverfahren ausgewählt wurde, direkte Vergleichswerte gewonnen werden.
Für den Fall einer Immunsuppression der normalen humoralen Immunantwort durch die Anästhesie interessiert außer dem Ausmaß der Suppression besonders der Angriffspunkt des Anästhetikums innerhalb des Immunsystems. Grundsätzlich ist zwischen einer temporären Hemmung der humoralen Immunantwort und einer dauerhaften Schädigung sowie zwischen einer das gesamte System betreffenden Suppression und einer partiellen Beeinflussung zu unterscheiden. Für einen immunsuppressiven Einfluß sind mehrere verschiedene Angriffspunkte möglich:

1) Hemmung der Antigenerkennung durch
   a) Hemmung der Makrophagenfunktion bei der Präsentierung von Antigenen für immunkompetenze B-Lymphozyten (s. Kap. 2.3.9.)
   b) Hemmung der T-Helfer-Zellen bei der Kooperation zwischen T-Helfer-Zelle und B-Zelle über eine Antigenbrücke (s. Kap. 2.3.6.)
   c) Direkte Hemmung der B-Zellen bei der Antigen-Antikörper-Reaktion (s. Kap. 2.3.7.)

2) Hemmung der laufenden humoralen Immunantwort durch
   a) Hemmung der Antikörperproduktion (s. Kap. 2.3.2.)
   b) Hemmung der Antikörpersekretion (s. Kap. 2.3.2.)
   c) Hemmung des Komplementsystems (s. Kap. 2.3.4.)
   d) Hemmung des "switch" der Immunglobulinklassen (s. Kap. 2.3.2.)

3) Hemmung des immunologischen Gedächtnisses durch
   a) Hemmung der B-Memory-Zellen (s. Kap. 2.3.7.)
   b) Hemmung der T-Helfer-Zellen (s. Kap. 2.3.6.)

Die vorliegende Arbeit läßt alle Angriffspunkte unter 1) und 2) zu. Um Einflüsse auf Angriffspunkte unter 3) festzustellen, ist die Untersu-

chung der sekundären Immunantwort erforderlich. Diese Arbeit kann Aussagen darüber erbringen, ob

1) ein immunsuppressiver Effekt durch die verwendeten Anästhetika verursacht wird und wie groß er ist;
2) eine gesonderte Beeinflussung der IgM-Antikörperproduktion verursacht wird;
3) eine gesonderte Beeinflussung der IgG-Antikörperproduktion verursacht wird.

Um Störungen im Bereich der Antigenerkennung (1 a) - c)) auszuschließen, wurden von BAUR et al. (33) entsprechende Versuche mit Anästhesie während einer bereits laufenden Immunantwort durchgeführt. Die sekundäre Immunantwort wurde ebenfalls von BAUR et al. (33) untersucht.

4. MATERIALIEN UND METHODEN

4.1. Materialien

4.1.1. Versuchstiere

Es wurden männliche Balb/c-Mäuse, gezogen von Bomholtsgard Ltd. (Ry/Dänemark), verwendet. Ihr Alter lag bei ungefähr 6 Wochen, ihr Gewicht betrug 20 - 25 g. Die Haltung erfolgte in Ställen mit je fünf Tieren (≙ 1 Versuchsgruppe).

4.1.2. Chemikalien

Anti-Maus-IgG (zur Verfügung gestellt von Dr. M. Wabl, Max Planck-Institut für Biologie, Tübingen)
Atropinsulfat, Amp. 0,0005 g (THILO)
Bovine Serum Albumin, 30 % (SIGMA)
Bupivacain, 0,5 % o.V. (Astra-Chemicals GmbH)
Fluoresceindiacetat (Serva, Heidelberg), 5 x krist., reinst, MG 416,4
Fötales Kälberserum (GIBCO, Glasgow)
Halothan, Fluothane® (ICI-Pharma)
Hammelblut (in Alsever-Lösung) (Behringwerke)
Hank's BSS (DULBECCO)
Meerschweinchenkomplement (Behringwerke)
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung, PBS-Dulbecco 1 x (Seromed, München)
Polyvinylpyrrolidone, PVP 40 (SIGMA)
RPMI-Medium 1640 mit Glutamin (GIBCO, Glasgow)
Saline, physiologische Kochsalzlösung
Vaseline, Paraplast

4.1.3. Geräte

Eppendorfpipetten (10 µl, 20 µl, 100 µl, 0 - 200 µl)
Eppendorfzentrifuge
Glasglocke (25 l) zur Narkose
Inkubator mit Thermostat (HERAEUS)
Kanülen 26 G 1/3

Klebeband, doppelseitig beschichtet, Breite 5 mm (3 M, Köln)
Mikroskop zur Auszählung der Plaques (Orthoplan-Phasenkontrastmikroskop, Leitz, Wetzlar, Vergr. 25 x)
Mikroskop zur Zellzählung (Fluoreszenzmikroskop, Leitz, Wetzlar)
Mikrotiterplatten II (FALCON)
Objektträger, 76 x 26 mm, 3 x 1", "geputzt"
Stahlsiebe, V 2A Mash 100
Vapour-Verdampfer zur Flow- und Konzentrationsbestimmung
Zählkammern (Neubauer improved)
Zentrifuge zum Waschen der Zellen (HERAEUS)

4.2. Methoden

4.2.1. Modifikation des Jerne-Plaque-Tests nach CUNNINGHAM (34)

Eine Modifizierung des Jerne-Plaque-Tests wurde 1966 von CUNNINGHAM (34) angegeben. Hier entfällt der Umgang mit Agargelen durch die Verwendung definierter Einfüllkammern, die speziell für diese Methode herzustellen sind. Dazu verwendet man je zwei gereinigte Objektträger, die mittels zweier doppelseitig beschichteten Klebebänder an den Schmalseiten deckungsgleich aufeinander fixiert werden. Ein drittes Klebeband in der Mitte unterteilt das Volumen in zwei gleich große Kammern. Die Höhe der Kammern entspricht der Dicke des Klebebandes, jede Kammer umfaßt ein Volumen von ca. 85 µl. In dieser spaltförmigen Kammer liegen die Zellen in einer einschichtigen Lage fixiert, wie es auch in einer Zählkammer der Fall ist.

Die erforderlichen Komponenten werden in Mikrotiterplatten gegeben und sorgfältig gemischt. Es wurden folgende Mengen zugesetzt:

100 µl der Hank's BSS
50 µl der Milzzellensuspension (Verdünnung s. Tab. 4)
10 µl der Erythrozytensuspension, Verdünnung 1:5 (= ca. $1{,}2 \times 10^7$ Erythr.)
10 µl Meerschweinchenserum

Für die indirekte Technik zusätzlich:

10 µl Anti-Maus-IgG (Verdünnung 1:50, s. Kap. 5.1.)

Mit Eppendorfpipetten wird das Gemisch in die hergestellten Kammern eingefüllt und diese durch Eintauchen in ein auf 50° C gehaltenes Paraplast-Vaseline-Gemisch (Mischungsverhältnis 2:1) luftdicht versiegelt. Danach werden die Kammern eine Stunde und 50 Min. lang bei 37° C inkubiert. Die Inkubationszeit darf zwei Stunden nicht übersteigen. Die Auszählung der Plaques erfolgt bei 25-facher Vergrößerung unter dem Phasenkontrastmikroskop.

4.2.2. Bestimmung der günstigsten Konzentration des Helferserums

Bei dem verwendeten Helferserum handelte es sich um die IgG-Fraktion des Serums eines Kaninchens, das mehrfach gegen monoklonales IgG_1 der Maus immunisiert worden war. Die Isolierung der IgG-Fraktion aus dem Kaninchenserum erfolgte durch 33 %ige Ammoniumsulfatfällung. Die hohe Zahl der erhaltenen indirekten Plaques beweist die hohe Reaktivität mit den übrigen IgG-Subklassen, so daß es als Sammelserum "Kaninchen-anti-Maus IgG" verwendet werden konnte.

Zur Bestimmung der günstigsten Konzentration des Helferserums wurden verschiedene Verdünnungen des Serums hergestellt und die Zahl der indirekten Plaques am 5. Tag nach Immunisierung mit Schafserythrozyten (8×10^8 Erythr./Maus) bei einer Versuchsgruppe von fünf Tieren bestimmt.

4.2.3. Immunisierung

Zur Immunisierung wurden Hammelerythrozyten verwendet. Vor der Injektion wurde das in Alsever-Lösung bei 4° C aufbewahrte Blut dreimal 10 Minuten lang bei 1000 g zentrifugiert. Gespritzt wurden 0,2 ml der 1:5 mit PBS verdünnten Erythrozytenlösung in eine der Schwanzvenen. Dies entspricht ca. 8×10^8 Zellen. Diese Dosis löst bei Mäusen die optimale Immunantwort aus (35). Um gleiche Immunogenität zu gewährleisten, muß diese Lösung vor der Immunisierung stets frisch hergestellt werden. Gründliches Aufschütteln vor dem Spritzen sorgt für eine konstante Konzentration.

4.2.4. Splenektomie und Gewinnung einer Milzzellsuspension

Die Tiere wurden durch Genickbruch getötet und sofort splenektomiert, wobei Verunreinigungen der Milz durch sorgfältige Präparation vermieden wurden. Die Milz wurde zur Abtrennung des Bindegewebes durch ein Sieb in eisgekühltes Nährmedium passiert. Das Umpipettieren in Zentrifugenröhrchen erfolgte unter Auf- und Absaugen, um eine gründliche Suspension zu gewährleisten. Zehnminütiges Abstellen auf Eis führte zur Sedimentation grober Verunreinigungen. Zur gründlichen Reinigung wurde eine dreimalige Zentrifugation in Medium für je 10 Minuten bei 4° C und 150 g vorgenommen.

4.2.5. Auszählung der lebenden Milzzellen

Die Anzahl der Milzzellen wurde nach Behandlung mit Fluoresceindiacetat (FDA) ermittelt. Dazu wurden 0,2 ml der Milzzellsuspension im Verhältnis 1:5 mit frisch hergestellter FDA-Arbeitslösung (FDA 1:1000 verdünnt in PBS) verdünnt. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit des FDA dürfen vom Ansetzen der Lösung bis zur Auszählung 2 Stunden nicht überschritten werden. Zur Aufspaltung des FDA in Fluorescein und Diacetat bedarf es einer spezifischen Hydrolase, die nur im Kern lebender Zellen auftritt. Es läuft also folgende Reaktion ab:

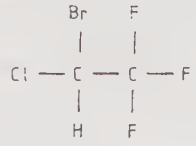
$$\text{FDA} \xrightarrow{\text{Hydrolase im Kern lebender Zellen}} \text{Fluorescein + Diazetat}$$

Abgestorbene Zellen und Zelltrümmer werden also nicht erfaßt. Zur Zählung wurden Neubauer-Zählkammern verwendet. Die normale Zellzahl der Milz beträgt bei Balb/c-Mäusen 10^7 bsi 10^8 Zellen.

4.2.6. Anästhesiemethoden (36, 37, 38)

4.2.6.1. Halothan-Narkose

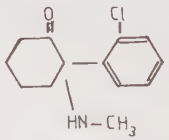
Halothan ist heute das meist verwendete Inhalationsnarkotikum. Es handelt sich um einen halogenierten Kohlenwasserstoff mit folgender Strukturformel:



Halothan besitzt gegenüber Äther den großen Vorzug, daß es schwer entflammbar ist. Ungünstige Nebenwirkungen sind vor allem Atemdepression und Blutdrucksenkung. Trotz seiner häufigen Verwendung ist es das leberschädlichste Anästhetikum, weshalb wiederholte Narkosen vor Ablauf von mindestens drei Monaten vermieden werden sollen. Die maximale klinische Konzentration beträgt 1,5 Vol. %.
Vor Beginn der Narkose wurden die Versuchstiere mit Atropin prämediziert, um die Bronchialsekretion zu hemmen. Die Injektion erfolgte intraperitoneal bei einer Konzentration von 0,1 mg/kg Körpergewicht.

Zur genauen Einhaltung der Halothankonzentration während der Narkose wurde ein geeichter Halothan-Vapor verwendet. Trägergas war 100 % O_2. Der Flow betrug 3 l O_2/min. Die Tiere wurden drei Stunden lang einer Konzentration von 1,5 % Halothan ausgesetzt, danach wurde die Konzentration auf 1 % gesenkt und die Narkose für eine weitere Stunde fortgesetzt.

4.2.6.2. Ketanest®-Anästhesie
Ketanest® (Ketamine) ist ein Injektionsnarkotikum mit folgender Strukturformel

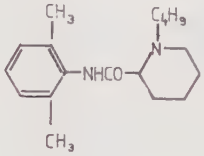


Es wird als i.v. Anästhetikum verwendet, kann in Notfällen aber auch i.m. injiziert werden. Die mittlere Dosis bei klinischer i.v. Anwendung beträgt 2 - 3 mg/kg Körpergewicht. Es bewirkt eine völlige Anästhesie bei nur oberflächlichem Schlaf. Man spricht daher auch von "dissoziativer" Anästhesie. Im Gegensatz zu Halothan kommt es nur zu geringer Atem- und Kreislaufbeeinflussung. Als Nebenwirkungen treten vor allem Muskelspasmen und psychische Angstzustände in der Aufwachphase auf. Häufig wird es deshalb mit muskelrelaxierenden Tranquilizern (z.B. Diazepam) kombiniert. Der Indikationsbereich erstreckt sich vor allem auf Kinder (mögliche Vermeidung der Intubationsnarkose) und kreislauflabile ältere Patienten.

Die Tiere erhielten zwei intraperitoneale Injektionen, zuerst 5 mg (= 200 mg/kg KG) und nach Ablauf von zwei Stunden weitere 2,5 mg (= 100 mg/kg KG). Nach der ersten Injektion zeigten die Mäuse unterschiedlich starke, ca. 30 sec. dauernde Krampfanfälle und waren anschließend ungefähr 30 Minuten lang vollständig betäubt. Danach auftretende Lähmungserscheinungen, besonders der hinteren Extremitäten, währten maximal 1 Stunde. Nach der zweiten Injektion traten lediglich Somnolenzerscheinungen auf, die nach 2 Stunden vollständig abgeklungen waren. Nach dieser Zeit wurden die Tiere durch Genickbruch getötet.

4.2.6.3. Bupivacain-Anästhesie

Bupivacain ist ein neueres Lokalanästhetikum mit langer Wirkungsdauer. Bei interkostaler Nervenblockade mit 30 ml 0,25 %iger Lösung beträgt die mittlere Wirkungsdauer 11 Stunden. Es wird für periphere Nervenblockaden, Epiduralanästhesie sowie für therapeutische und diagnostische Blockaden eingesetzt. Bupivacain ist 4 x toxischer als Lidocain. Die Strukturformel lautet:



Wie auch bei allen anderen neueren Lokalanästhetika mit Säureamidbindung sind auch bei Bupivacain sehr selten allergische Reaktionen beobachtet worden.

Bei den Versuchstieren erzeugte eine einmalige intraperitoneale Injektion von 1 mg Bupivacain starke Somnolenzzustände, jedoch keine vollständige Analgesie. Alle sichtbaren äußeren Anzeichen verschwanden innerhalb von 30 Minuten. Zum Zeitpunkt der Tötung zwei Stunden nach der Injektion waren die Tiere äußerlich völlig unauffällig.
In Abbildung 6 ist der Serumspiegel von Bupivacain im arteriellen Blut der Balb/c-Maus nach i.p. Injektion von 1 mg Bupivacain in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt.

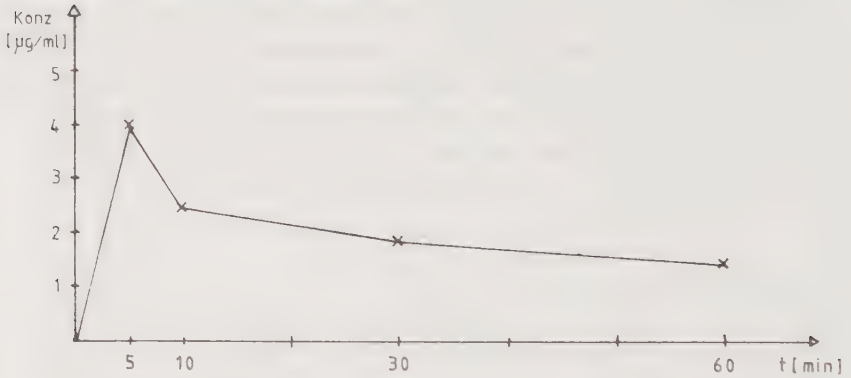


Fig.6. Serumspiegel von Bupivacain im arteriellen Blut der Balb/c-Maus nach i.p. Injektion von 1mg Bupivacain

4.2.7. Vorversuch zur Erprobung des Verfahrens und zur Bestimmung der Meßtage

Die humorale Primärantwort von Balb/c-Mäusen wurde nach Immunisierung mit Schafserythrozyten aufgezeichnet. Es wurden Versuchsgruppen mit je fünf Mäusen gebildet und nach Splenektomie (s. Kap. 3.4.7.) mittels des Jerne-Plaque-Tests (s. Kap. 3.4.1.) am 3., 4., 5., 6., 7., 8., 10., 12. und 14. Tag nach der Immunisierung (Tag 0) die Anzahl IgM-Plaques bildender Zellen und die Anzahl IgG-Plaques bildender Zellen bestimmt.

Dieser Vorversuch diente außerdem zur Ermittlung der günstigsten Verdünnungsverhältnisse der Milzzellsuspensionen für die Plaque Technik. Sie sollten stets so gewählt werden, daß die Plaquezahlen zwischen 100 und 200 pro Kammer liegen, weil in diesem Bereich der Zählfehler am kleinsten ist.

4.2.8. Vorversuch zum Nachweis eventueller Einflüsse der Atropinprämedikation und/oder der Begasung mit 100 % O_2 während der Halothannarkose

Um eventuelle Einflüsse der Atropinprämedikation und/oder der Begasung mit 100 % Sauerstoff im Rahmen der Halothannarkose festzustellen, wurde in einem weiteren Vorversuch eine Gruppe von fünf Mäusen nach Immunisierung mit Schafserythrozyten einer i.p. Injektion mit Atropin (0,1 mg/kg Körpergewicht) und einer 4-stündigen Begasung mit 100 % Sauerstoff ausgesetzt und mit einer immunisierten Kohtrollgruppe verglichen. Der Plaquetest wurde am 5. Tag nach der Immunisierung durchgeführt, weil hier die Anzahl IgM-produzierender Plasmazellen noch relativ hoch ist und die Anzahl IgG-produzierender Plasmazellen hier ihren Gipfel erreicht, so daß gute Aussagen über beide Immunglobulinklassen möglich sind.

4.2.9. Hauptversuch zum Vergleich der Wirkungen von Halothan, Bupivacain und Ketanest® auf die humorale Primärantwort von Balb/c-Mäusen

Hier wurden parallel die Wirkungen von Halothan, Bupivacain und Ketanest® auf die Primärantwort am 4., 5. und 6. Tag nach Anästhesie ermittelt. Die Immunisierung erfolgte gleichzeitig mit der Anästhesie. E- wurden die IgM-Antwort und die IgG-Antwort untersucht. Durch die Auswahl der Tage 4 und 5 werden die Gipfel sowohl der IgM-Antwort als auch der IgG-Antwort erfaßt (s. Kap. 4.2.7. u. 5.2.). Die Untersuchung am 6. Tag sollte Auskunft darüber geben, ob die Antwort normal abklingt oder ob vielleicht eine Verschiebung des Maximums auf einen späteren Zeitpunkt erfolgt.

Alle Versuchsgruppen bestanden aus 5 Mäusen und werden mit demselben Nullwert verglichen, einer mit Schafserytrozyten immunisierten Gruppe. Der Zeitpunkt der Tötung der Tiere wurde auf 96,120 bzw. 144 Stunden nach Immunisierung festgesetzt, um Veränderungen, die innerhalb eines Tages ablaufen, auszuschalten. "1 Tag" entspricht also genau 24 Stunden.

4.2.10. Hauptversuch mit direktem Vergleich der Wirkungen von Halothan und Ketanest® auf die humorale Immunantwort von Balb/c-Mäusen

Um einen direkten Vergleich zwischen den Wirkungen von Halothan und Ketanest® zu ermöglichen, die sich im 1. Hauptversuch deutlich unterschieden, wurde ein zweiter Versuch durchgeführt, bei dem nur diese beiden Anästhetika verwendet wurden (keine Kontrollgruppe). Einer Gruppe mit Halothannarkose wurde eine mit Ketanest® anästhesierte und sonst unter gleichen Bedingungen (i.p. Injektion von Atropin und 4-stündige Begasung mit 100 % O_2) gehaltene gegenübergestellt. Auf diese Weise wurde auch versucht, Einflüsse durch psychischen Streß bei allen Tieren möglichst gleich zu halten. Um eventuelle zeitliche Verschiebungen in der Antwortkurve sicher zu erfassen, wurde der Versuchszeitraum im Vergleich zum ersten Versuch um die Tage 7 und 10 erweitert. Es wurden wiederum die IgM-Antwort und die IgG-Antwort ermittelt.

4.2.11. Statistische Auswertung (39, 40)

Die Zahlen plaquebildender Zellen sind nicht normalverteilt; wie DRESSER (40) 1973 zeigte, folgen jedoch die Logarithmen dieser Werte einer Normalverteilung. Daher erfolgt die Auswertung unter Verwendung der Logarithmen zur Bestimmung von Mittelwerten und Standardabweichungen. Als einheitliche Bezugsgröße für alle erhaltenen Plaquezahlen wurden 10^6 Milzzellen festgelegt. Daraus folgt, daß die Standardabweichungen bei der Rückrechnung auf die Numeri nicht mehr symmetrisch ($\pm$ x), sondern durch einen Faktor s angegeben werden, mit dem die Mittelwerte multipliziert bzw. dividiert werden müssen. Die Signifikanzberechnung erfolgte mit dem "t-Test". Signifikanzschranke war $p < 0{,}05$. Werte $< 0{,}05$ besagen nicht, daß kein Unterschied zwischen den Meßreihen vorliegt, auch hier können bei Verwendung größerer Versuchskollektive eventuell signifikante Unterschiede auftreten.

5. ERGEBNISSE

5.1. Die günstigste Konzentration des Helferserums

Die höchsten Werte für indirekte Plaques ergaben sich bei Verdünnungen von 1:20 und 1:50. Daher wurde die Verdünnung von 1:50 für alle weiteren Versuche beibehalten. Die Ergebnisse sind Tabelle 3 und Figur 7 zu entnehmen.

Tier Nr.	IgM→IgG-Plaques / 10^6 Milzzellen			
	Serum 1:10	Serum 1:20	Serum 1:50	Serum 1:100
1	705	836	878	456
2	912	1244	1293	495
3	794	1526	1437	503
4	476	927	1298	463
5	843	1313	997	518

Tab.3: Die günstigste Konzentration des Helferserums

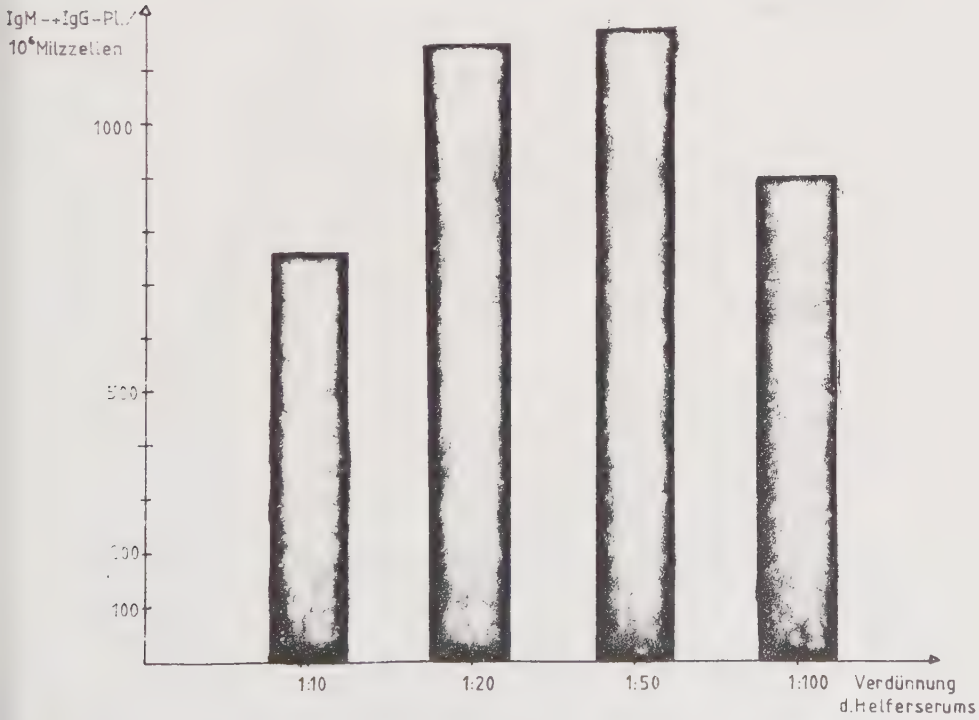


Fig.7: IgM→IgG-Plaques nach Verwendung verschiedener Verdünnungen des Helferserums

5.2. Die normale humorale Primärantwort von Balb/c-Mäusen

Die Aufzeichnung der IgM-Antwort ergab einen anfänglichen steilen Anstieg mit ausgeprägtem Gipfel am 4. Tag nach der Immunisierung. Der folgende Abfall verlief ebenfalls steil bis zum 6. Versuchstag. Danach ergab sich eine starke Abflachung der Kurve bis zum 14. Versuchstag (s. Tab. 5, Fig. 8).
Auch die IgG-Produktion zeigte einen deutlichen Gipfel, und zwar am 5. Tag nach der Immunisierung. Bis zum 4. Versuchtstag fand keine IgG-Produktion statt, der Anstieg verlief also sehr steil. Auch der Abfall erfolgte bis zum 7. Versuchstag relativ steil, danach langsam und stetig (s. Tag. 6, Fig. 9). Diese Ergebnisse stimmen gut mit den Angaben von SZELL (41) überein. Für alle folgenden Versuche wurden als Versuchstage die Tage 4, 5, 6 nach Anästhesie und Immunisierung gewählt, um die Gipfel der IgM- als auch der IgG-Produktion zu erfassen. Tag 6 wurde hinzugenommen, um eventuelle zeitliche Verschiebungen der Gipfel zu erfassen. Die günstigsten Verdünnungen der Milzzellensuspension an den verschiedenen Versuchstagen sind Tabelle 4 zu entnehmen.

Tag	Verdünnung der Milzzellsuspensionen für	
	IgM-Plaques	IgM-+IgG-Plaques
4	1:4	—
5	1:2	1:4
6	2:1	1:2
7	2:1	1:1
8	2:1	1:1
10	2:1	1:1
12	4:1	2:1
14	10:1	4:1

Tab.4: Erforderliche Konzentrationen der Milzzellsuspensionen, um Zählwerte von 100-300 Plaques/Platte zu erhalten

IgM - Antwort bei normaler Primärreaktion

Tag	Plaquebildende Zellen (PbZ)	Faktor s
3	268	1,41
4	874	1,33
5	502	1,42
6	185	1,29
7	168	1,26
8	135	1,41
10	98	1,26
12	90	1,15
14	26	1,49

Tab.5: Anzahl plaquebildender Zellen bei normaler Primärreaktion (Mittelwerte); Faktor s gibt die Standardabweichung an

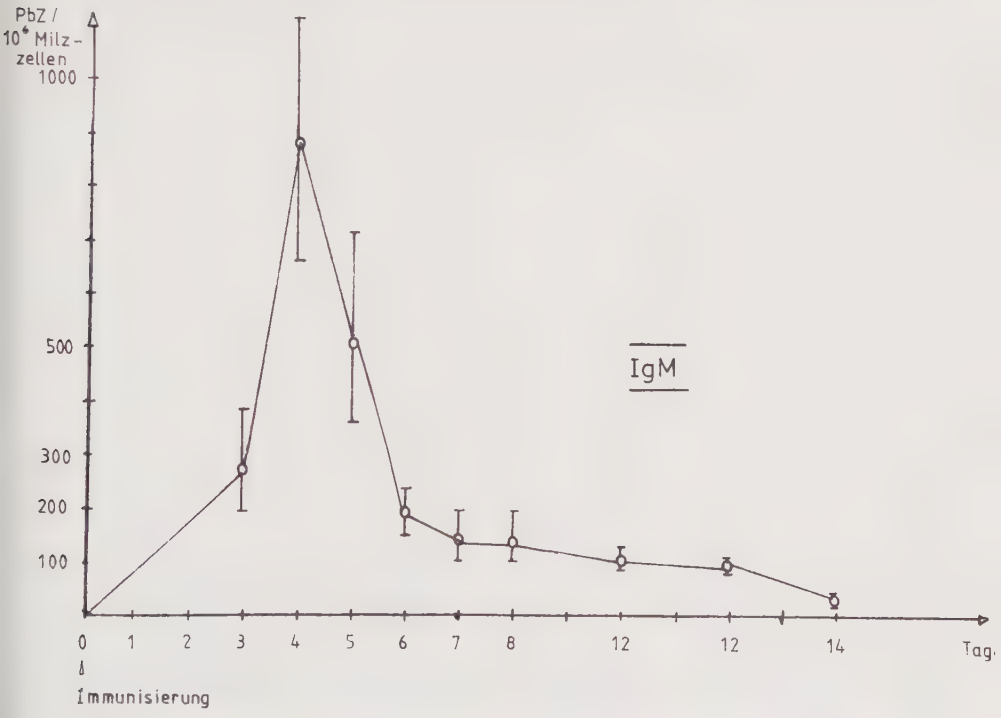


Fig.8: Normale Primärreaktion, Mittelwerte und Standardabweichungen

IgG-Antwort bei normaler Primärreaktion

Tag	Plaquebildende Zellen (Pbz)	Faktor s
5	704	1,43
6	294	1,56
7	131	1,30
8	165	1,77
10	142	1,87
12	73	2,26
14	59	1,41

Tab. 6 :
Anzahl plaquebildender Zellen bei norma
Primärreaktion (Mittelwerte); Faktor s g
die Standardabweichung an

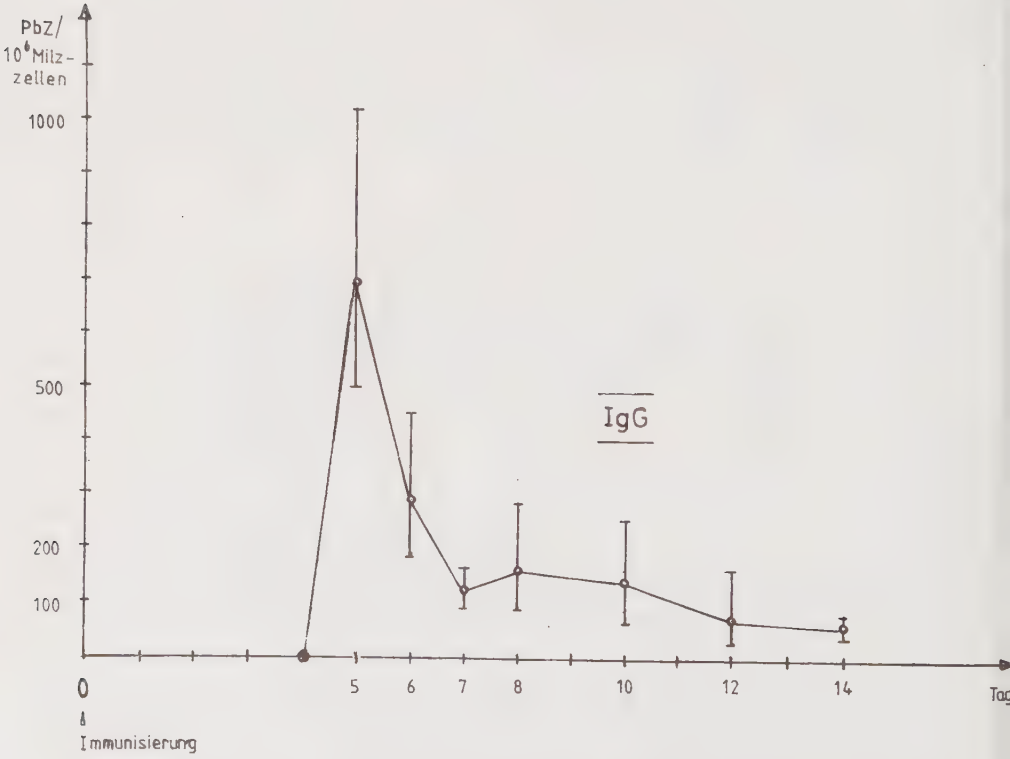


Fig. 9 : Normale Primärreaktion, Mittelwerte u. Standardabweichungen

5.3. Einflüsse der Prämedikation mit Atropin und der Begasung mit 100 % O_2

Der Versuch zeigte, daß durch Prämedikation mit Atropin und 4-stündige Begasung mit 100 % O_2 keine Reduktion der Anzahl plaquebildender Zellen (PbZ) verursacht wird. Die Antikörperproduktion der Plasmazellen war sowohl bei IgM als auch bei IgG normal. Bei der IgM-Antwort waren die Werte für Testgruppe und Kontrollgruppe nahezu identisch (s. Tab. 7, Fig. 10, 11), bei der IgG-Antwort ergab sich eine Steigerung um 30 %, jedoch ohne statistische Signifikanz (s. Tab. 8, Fig. 12, 13). Dennoch wurde für die folgenden Versuche die i.p. Injektion von Atropin und die 4-stündige Begasung mit 100 % O_2 bei den Kontrollgruppen beibehalten, um den psychischen Streß bei allen Versuchstieren möglichst gleich zu halten.

IgM-Antwort nach Prämedikation mit Atropin und Begasung mit 100 % O_2

Tag	IgM-Plaques [%]	Faktor s
5	108	1,18

Tab.7 IgM-Plaques in % des Kontrollwertes; Faktor s gibt die Standardabweichung an

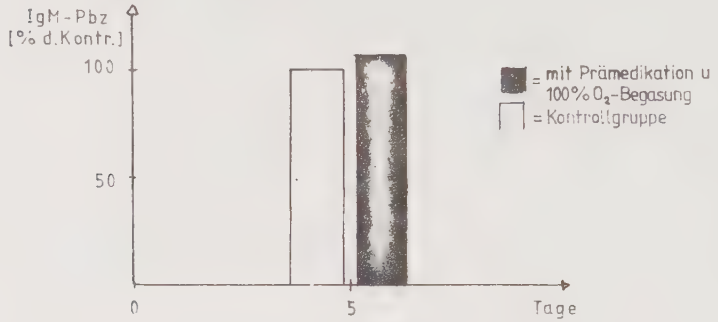


Fig.10: IgM-Plaques bildende Zellen (PbZ), Relation zum Kontrollwert [%]

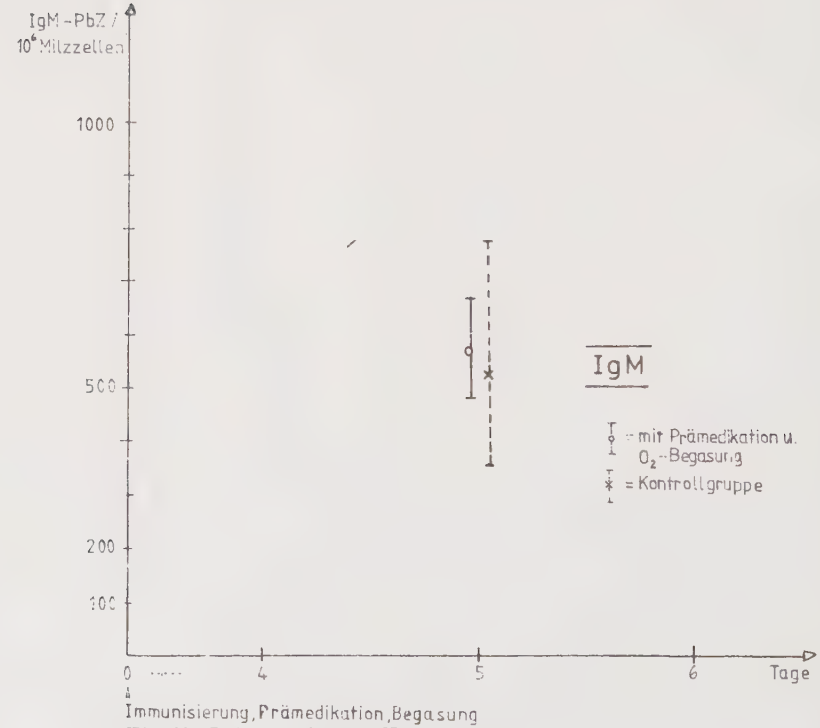


Fig.11: IgM-Antwort, Tag 5, Mittelwerte und Standardabweichungen

IgG-Antwort nach Prämedikation mit Atropin und Begasung mit 100 % O_2

Tag	IgG-Plaques [%]	Faktor s
5	132	1,66

Tab.8: IgG-Plaques in % des Kontrollwertes; Faktor s gibt die Standardabweichung an

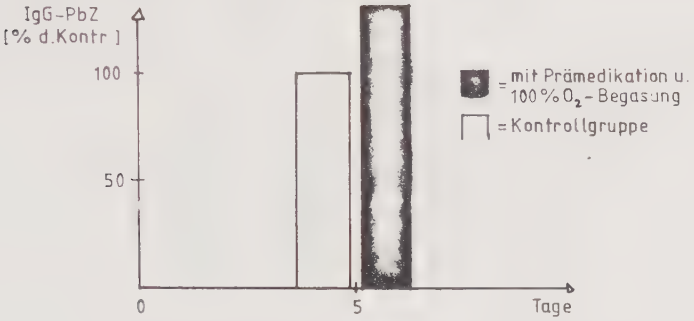


Fig.12: IgG-Plaques bildende Zellen (PbZ), Relation zum Kontrollwert [%]

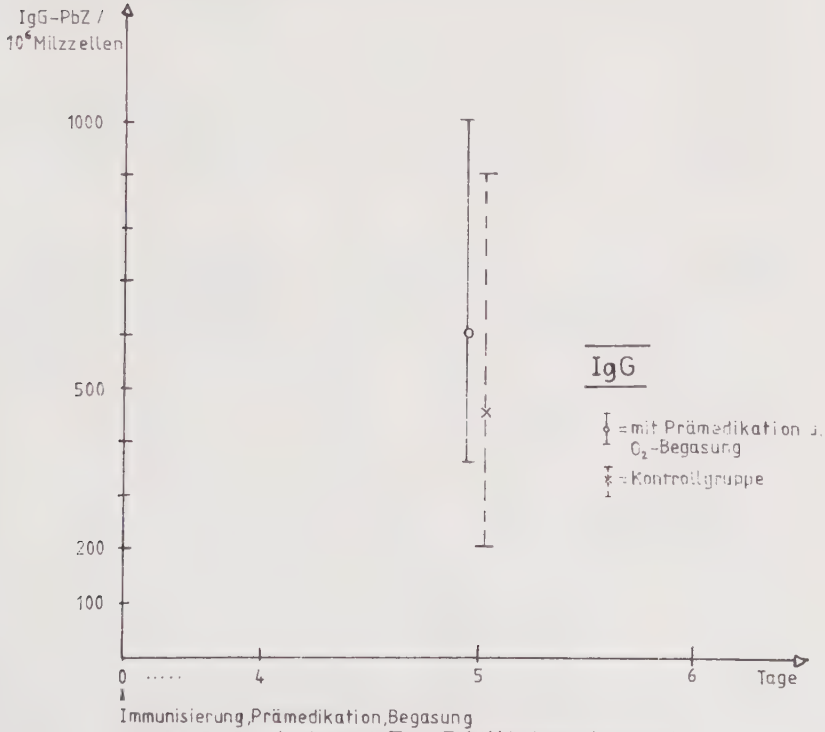


Fig.13: IgG-Antwort, Tag 5, Mittelwerte und Standardabweichungen

5.4. Vergleich der Wirkungen von Halothan, Ketanest® und Bupivacain auf die humorale Primärantwort von Balb/c-Mäusen

Es wurde eindeutig gezeigt, daß keines der verwendeten Anästhetika die primäre IgM-Antwort beeinflußt. An sämtlichen Versuchstagen stimmten die Werte der Versuchsgruppen praktisch mit dem Kontrollwert überein, es traten also auch keine zeitlichen Verschiebungen in der IgM-Produktion auf.

Bei der Testgruppe mit Halothannarkose lagen die Zählwerte zwischen 95 % und 107 % im Vergleich zur Kontrollgruppe (s. Tab. 9, Fig. 14, 15), bei der Testgruppe mit Ketanest®-Anästhesie zwischen 95 % und 116 % (s. Tab. 10, Fig. 16, 17) und bei der Testgruppe mit Bupivacain zwischen 97 % und 106 % (s. Tab. 11, Fig. 12, 19).

Unterschiedliche Ergebnisse ergaben sich bei der Untersuchung der IgG-Antwort. Bei Halothan trat eine deutliche Verminderung der IgG-Plaques auf. Am 5. Versuchstag betrug sie 53 %, am 6. Versuchstag 81 % (s. Tab. 12, Fig. 20, 21). Statistisch konnte keine Signifikanz nachgewiesen werden, p war in allen Fällen > 0,05.

Die Ketanest®-Testgruppe zeigte bei der IgG-Antwort nur geringe Unterschiede zum Kontrollwert. Der Gipfel am 5. Versuchstag war um 6 %, der Zählwert am 6. Versuchstag um 27 % erniedrigt (s. Tab. 13, Fig. 22, 23).

Die mit Bupivacain anästhesierten Tiere zeigten ebenfalls eine abgeschwächte IgG-Antwort. Die Reduktion IgG-produzierender Zellen war mit 37 % am 5. Versuchstag und 42 % am 6. Versuchstag kleiner als nach Halothannarkose. Die Verminderung war nicht statistisch signifikant (s. Tab. 14, Fig. 24, 25).

IgM - Antwort nach Halothannarkose

Tag	IgM-Plaques[%]	Faktor s
4	105	1,35
5	107	1,19
6	95	1,21

Tab. 9: IgM-Plaques in % des Kontrollwertes; Faktor s gibt die Standardabweichung an

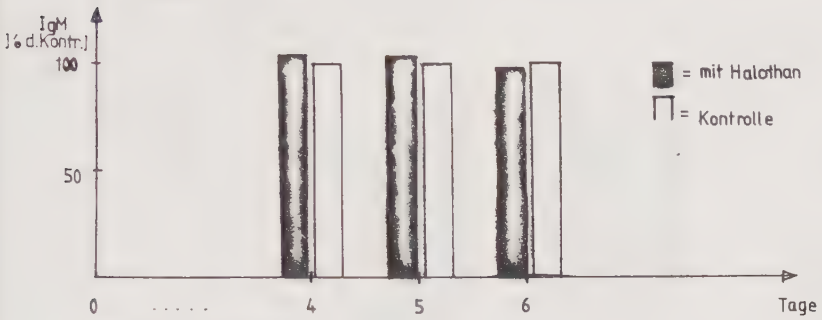


Fig. 14 : IgM-Antwort in Relation zum Kontrollwert (in %)

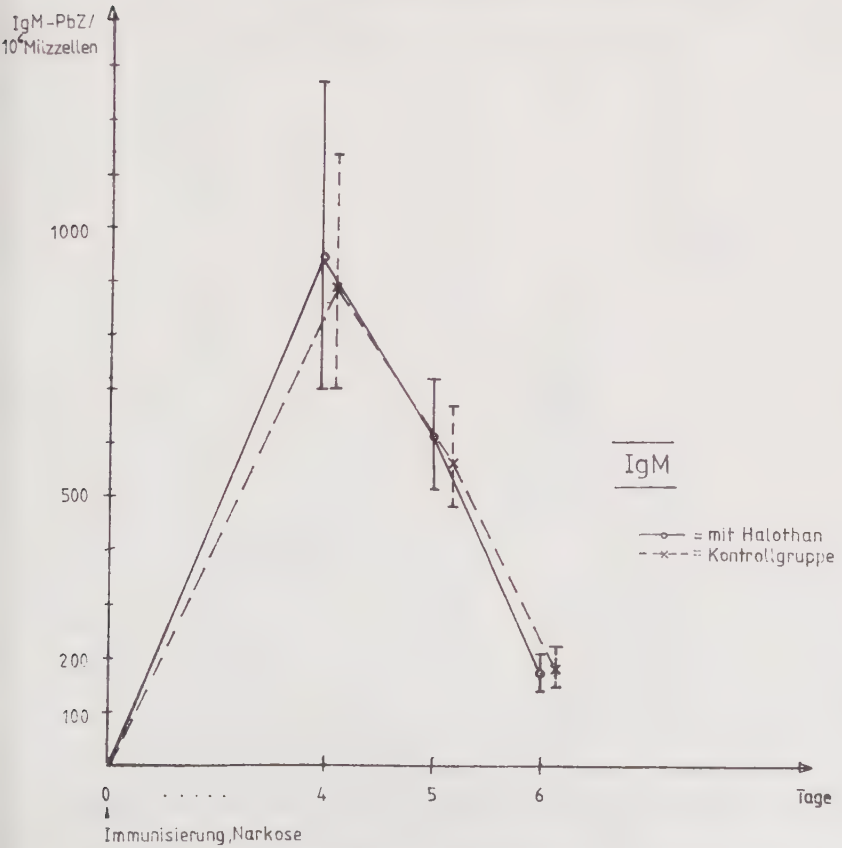
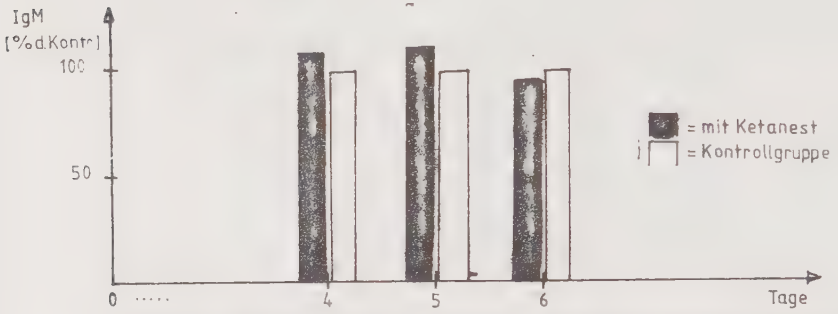


Fig. 15 : IgM-Antwort, Tage 4-6, Mittelwerte u. Standardabweichungen

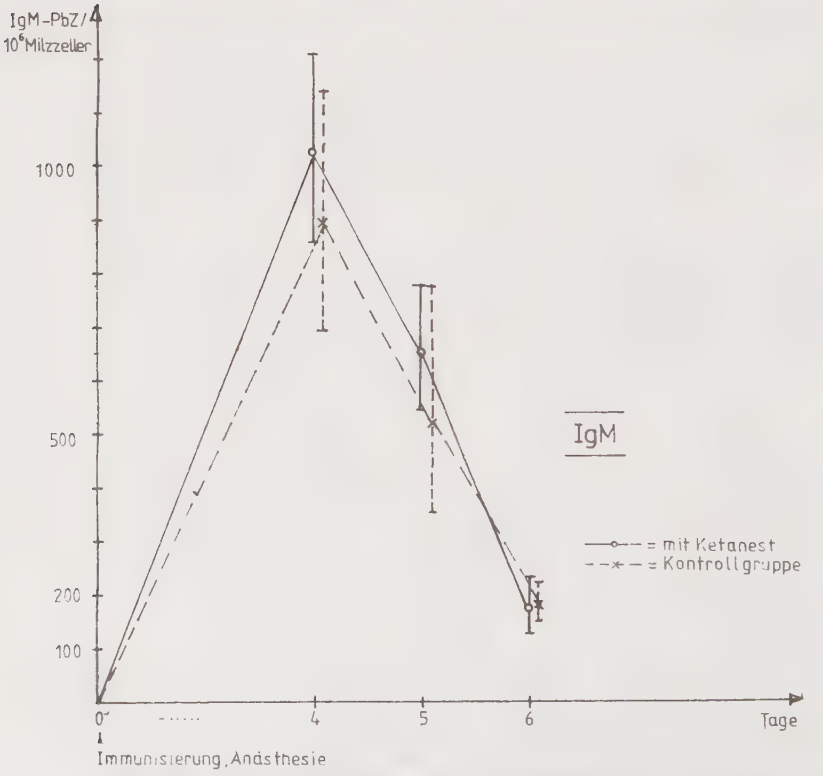
Ig M - Antwort nach Ketanest - Anästhesie

Tag	IgM-Plaques[%]	Faktor s
4	114	1,18
5	116	1,72
6	95	1,34

Tab.10 IgM-Plaques in % des Kontroll-wertes, Faktor s gibt die Standardab-weichung an



Figur 16 : IgM-Antwort in Relation zum Kontrollwert (in %)



Figur 17 : IgM-Antwort, Tage 4-6 Mittelwerte u. Standardabweichungen

IgM-Antwort nach Bupivacain-Anästhesie

Tag	IgM-Plaques [%]	Faktor s
4	97	1,24
5	106	1,33
6	102	1,34

Tab. 11: IgM-Plaques in % des Kontrollwertes; Faktor s gibt die Standardabweichung an

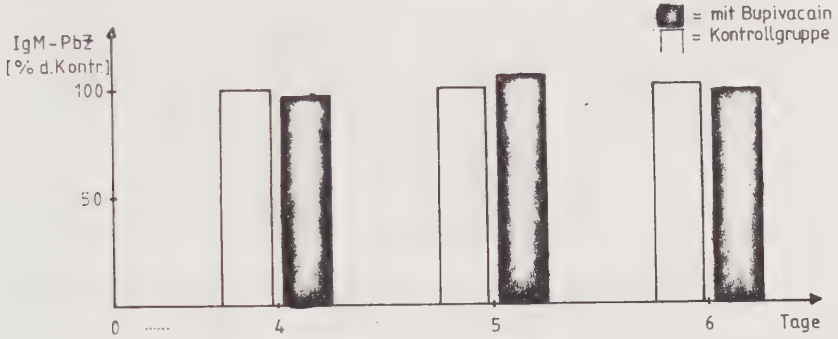


Fig. 18: IgM-Plaques bildende Zellen (PbZ), Relation zum Kontrollwert [%]

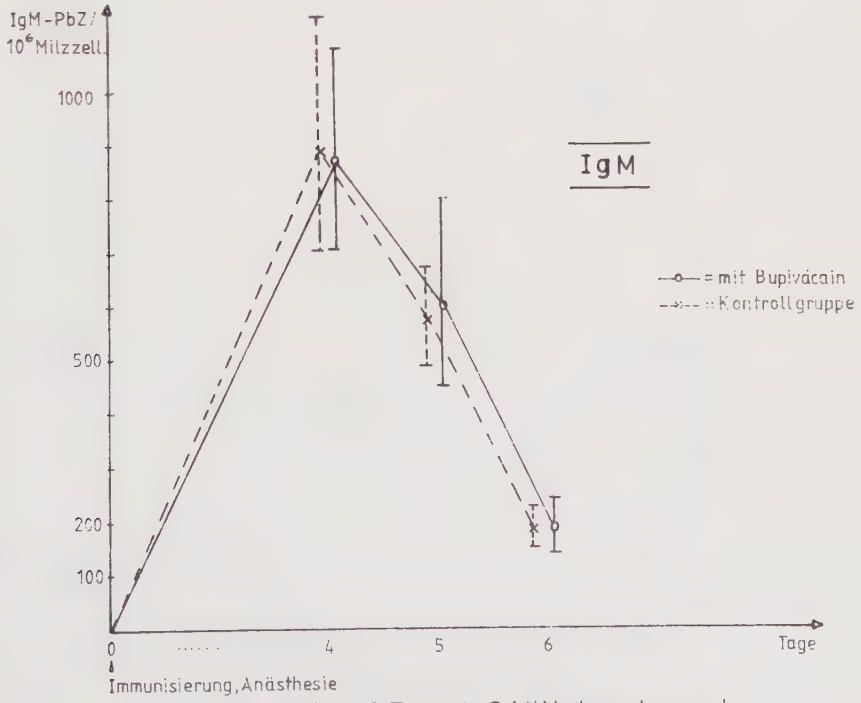


Fig. : IgM-Antwort, Tage 4-6, Mittelwerte und Standardabweichungen

IgG-Antwort nach Halothannarkose

Tag	IgG-Plaques [%]	Faktor s	p
5	47	1,41	>0,05
6	19	2,99	>0,05

Tab 12: IgG-Plaques in % des Kontrollwertes; Faktor s gibt die Standardabweichung an

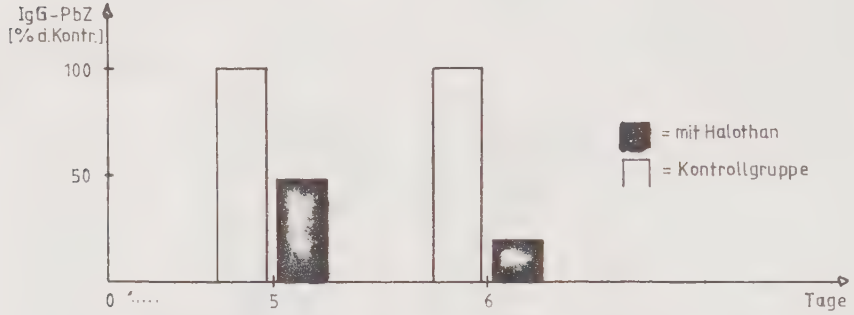


Fig.20: IgG-Plaques bildende Zellen (PbZ), Relation zum Kontrollwert [%]

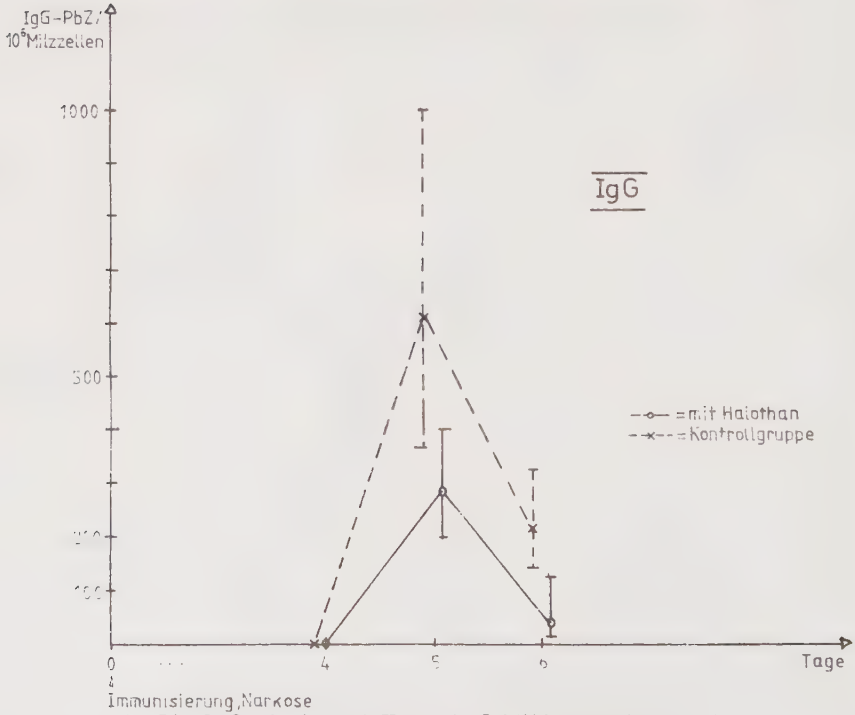


Fig. 21: IgG-Antwort, Tage 4-6, Mittelwerte und Standardabweichungen

IgG-Antwort nach Ketanest-Anästhesie

Tag	IgG-Plaques [%]	Faktor s	p
5	94	1,72	>0,05
6	73	1,72	>0,05

Tab. 13: IgG-Plaques in % des Kontrollwertes; Faktor s gibt die Standardabweichung an

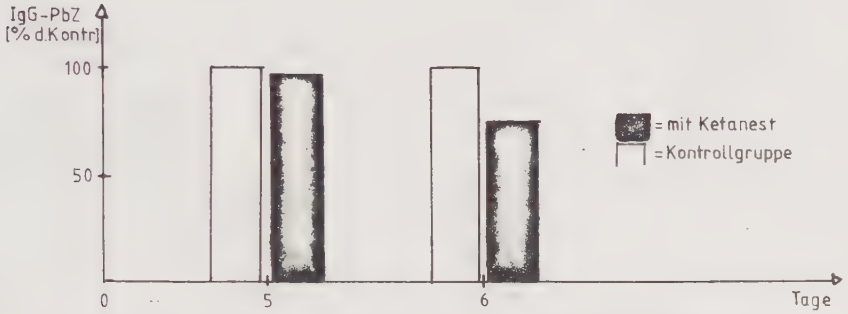


Fig. 22: IgG-Plaques bildende Zellen (PbZ), Relation zum Kontrollwert [%]

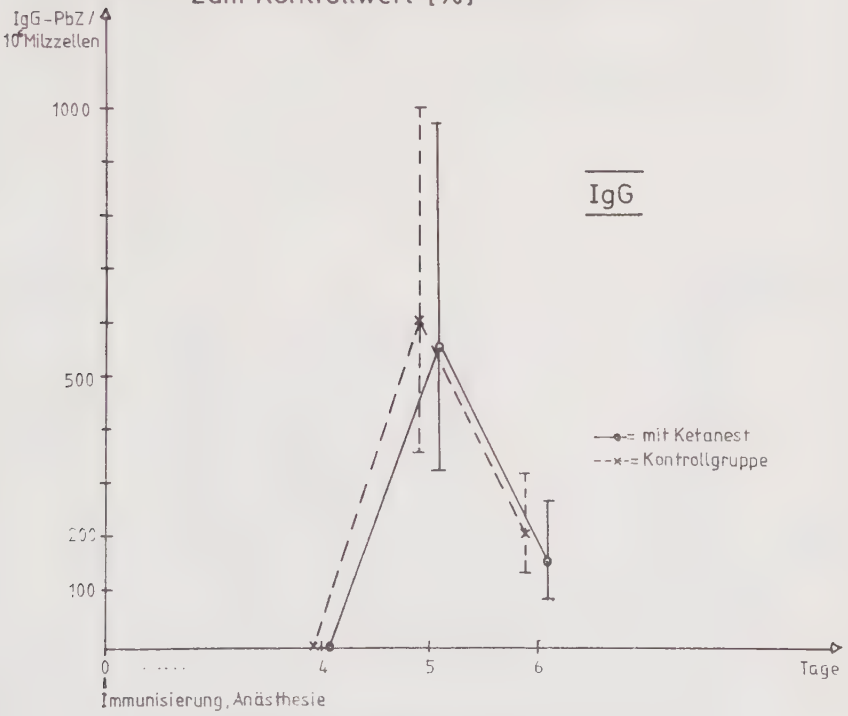


Fig. 23: IgG-Antwort, Tage 4-6, Mittelwerte und Standardabweichungen

IgG-Antwort nach Bupivacain-Anästhesie

Tag	IgG-Plaques [%]	Faktor s	p
5	63	2,06	>0,05
6	58	2,75	>0,05

Tab.14: IgG-Plaques in % des Kontrollwertes; Faktor s gibt die Standardabweichung an

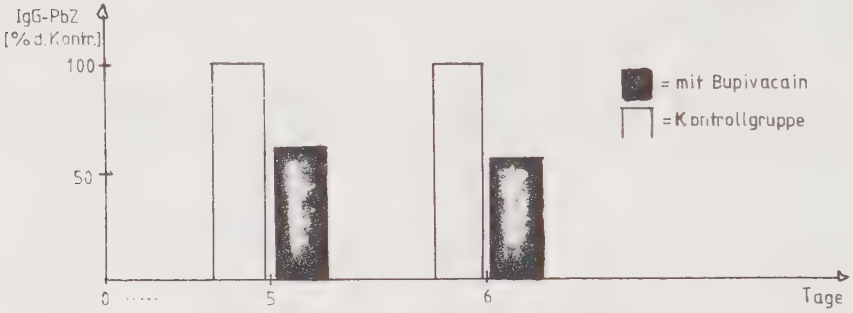


Fig.24: IgG-Plaques bildende Zellen (PbZ), Relation zum Kontrollwert [%]

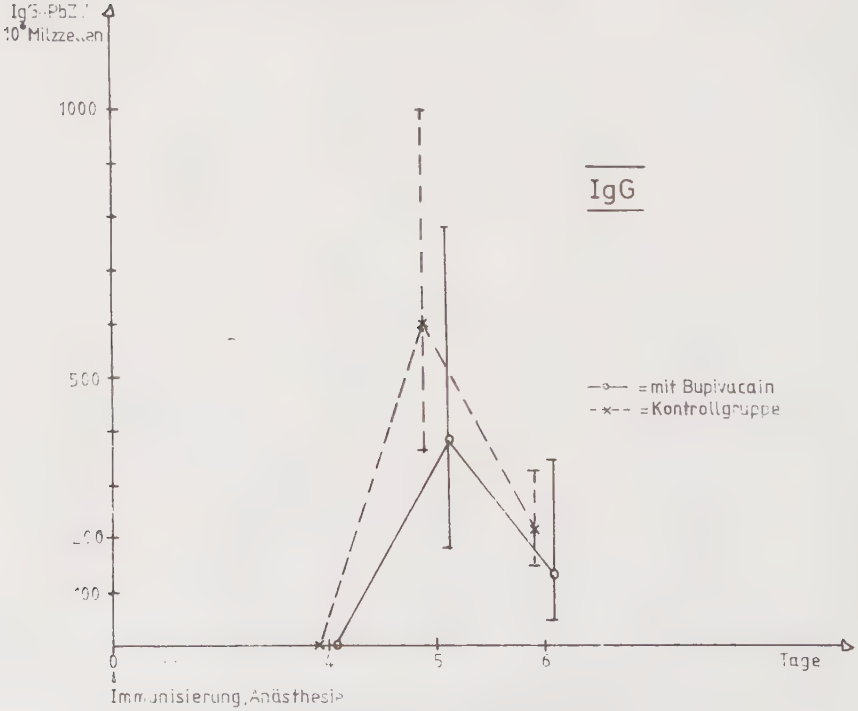


Fig.25: IgG-Antwort, Tage 4-6, Mittelwerte und Standardabweichungen

5.5. Direkter Vergleich der Wirkungen von Halothan und Ketanest® auf die humorale Primärantwort von Balb/c-Mäusen

Hier konnte eindeutig gezeigt werden, daß die IgM-Antwort nach Verwendung von Halothan gleich abläuft wie nach Gabe von Ketanest®. Es unterschieden sich weder die Anzahl der erhaltenen Plaques noch der zeitliche Verlauf der Antwort (s. Tab. 15, Fig. 26, 27).

Bei der IgG-Antwort hingegen bewirkte die Halothan-Narkose erneut eine deutliche Verminderung der Plaquezahlen gegenüber dem Kontrollwert, die zwischen 26 % (6. Versuchstag) und 43 % (5. Versuchstag) lag. Der Scheitelpunkt der Kurve lag unverändert bei Versuchstag 5. Die Verminderung war nicht statistisch signifikant (s. Tab. 16, Fig. 28, 29).

IgM-Antwort nach Halothan-Narkose, Kontrollwert mit Ketanest

Tag	IgM-Plaques [%]	Faktor s
4	87	1,21
5	87	1,66
6	100	1,18
7	109	1,42
10	110	1,20

Tab.15: IgM-Plaques in % des Kontrollwertes; Faktor s gibt die Standardabweichung an

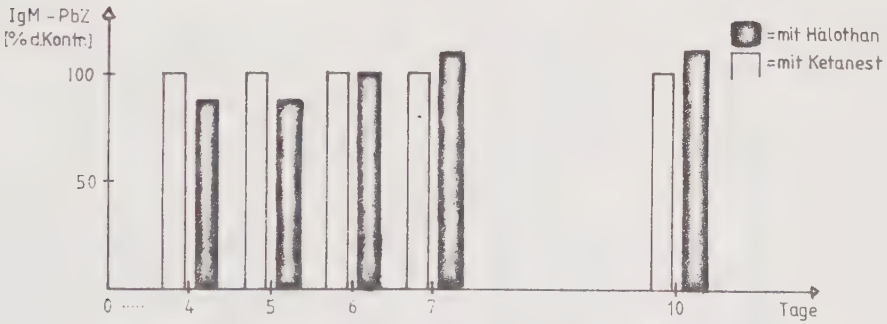


Fig.26: IgM-Plaques bildende Zellen (PbZ), Relation zum Kontrollwert [%]

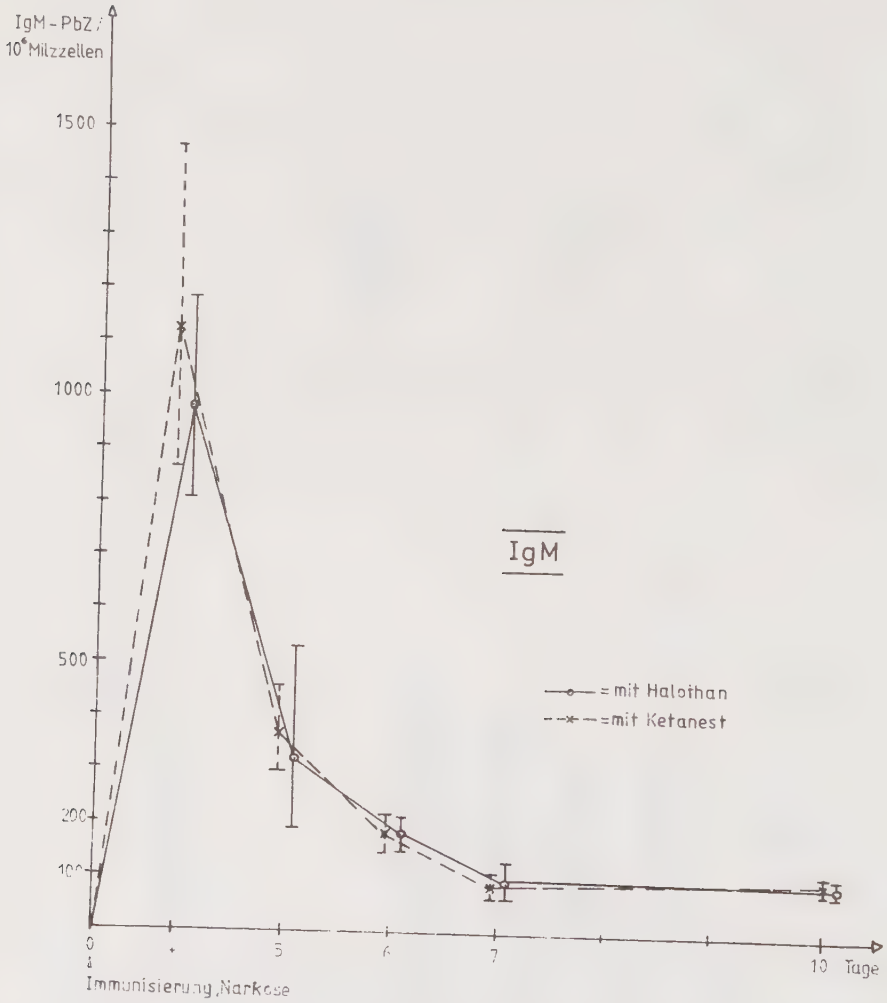


Fig. 27: IgM - Antwort, Tage 4-7u.10, Mittelwerte und Standardabweichungen

IgG-Antwort nach Halothan-Narkose, Kontrollwert mit Ketanest-Anästhesie

Tag	IgG-Plaques [%]	Faktor s	p
5	57	2,04	>0,05
6	74	2,82	>0,05
7	72	1,95	>0,05
10	65	1,47	>0,05

Tab.14: IgG-Plaques in % des Kontrollwertes; Faktor s gibt die Standardabweichung an

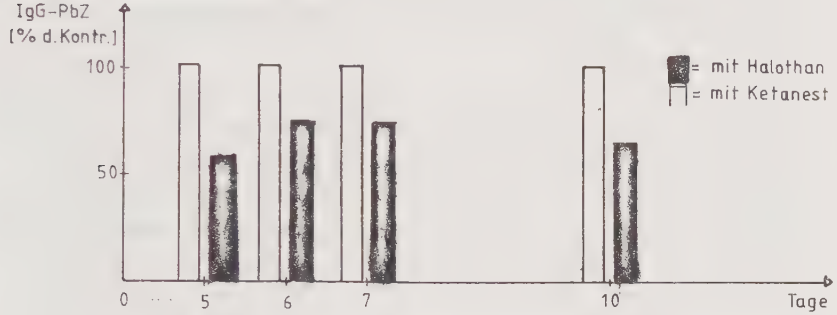


Fig.28: IgG-Plaques bildende Zellen (PbZ), Relation zum Kontrollwert [%]

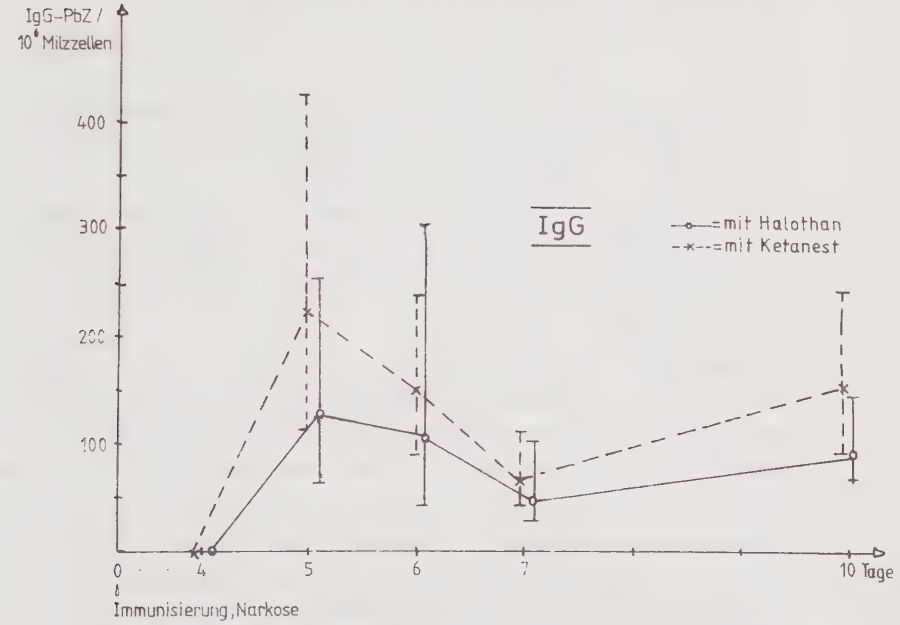


Fig.29: IgG-Antwort, Tage 4-7u.10, Mittelwerte und Standardabweichungen

6. DISKUSSION

Der Jerne Plaque-Test in der Modifikation nach CUNNINGHAM erwies sich als praktisches und genaues Verfahren für die Aufzeichnung einer humoralen Immunantwort. Das verwendete Helferserum ermöglichte einen zuverlässigen Nachweis von IgG-produzierenden Plasmazellen. Es war also möglich, genaue Aufzeichnungen der IgM Antwort und der IgG-Antwort durchzuführen.

Die Verwendung der Anästhetika Halothan, Ketanest® und Bupivacain blieb eindeutig ohne Einfluß auf die IgM-Antwort (s. Kap. 5.4.). Wie die Untersuchung der normalen humoralen Primärantwort zeigte, beginnt die Immunantwort mit einer ausschließlichen IgM-Produktion (s. Kap. 5.2.). Erst am 4. Tag beginnt die IgG-Antwort. Somit wird offensichtlich weder die Auslösung noch die anfängliche Intensität einer humoralen Immunantwort durch die verwendeten Anästhetika beeinflußt. Eine Störung der Antigenerkennung liegt demnach nicht vor. Der T-zellunabhängige Teil der humoralen Primärantwort (s. Kap. 2.3.8.) funktioniert normal.

Eine ganze Reihe möglicher Angriffspunkte für einen immunsuppressiven Einfluß (s. Kap. 3.) können daher ausgeschlossen werden:

1) Eine Hemmung der Makrophagenfunktion bei der Präsentierung von Antigenen für immunkompetente B-Zellen findet nicht statt (s. Kap. 2.3.9.).
2) Eine direkte Hemmung der B-Zellen bei der Antigen-Antikörper-Reaktion erfolgt nicht (s. Kap. 2.3.7.).
3) Eine allgemeine Hemmung der Antikörperproduktion und oder Antikörpersekretion tritt nicht auf.

Unterschiedliche Ergebnisse ergaben sich bezüglich der IgG-Antwort. Die Versuchsgruppen mit Halothan-Narkose und Bupivacain-Anästhesie zeigten deutliche Verminderungen in der IgG-Produktion. Die Verwendung von Ketanest® hingegen blieb ohne suppressiven Einfluß (s. Kap. 5.4.).

Eine besonders deutliche Reduktion ergab sich bei den Testgruppen mit 4-stündiger Narkose durch Halothan. Obwohl die Unterschiede zum Kontrollwert nicht statistisch signifikant waren, erscheint bei einer Suppression plaquebildender Zellen zwischen 53 % und 81 % eine un-

günstige Wirkung auf die IgG-Produktion wahrscheinlich, zumal auch in einem direkten Vergleich von Halothan und Ketanest® eine deutliche Verminderung plaquebildender Zellen durch Halothan gefunden wurde. Weitere Untersuchungen mit entsprechend vergrößerten Testgruppen könnten hier statistisch signifikante Ergebnisse liefern. Statistisch signifikante Verminderungen der IgG-Produktion wurden von BAUR (33) et al. bei Langzeitapplikation von 0,3 Vol. % Halothan bei Balb/c-Mäusen gefunden.

In deutlich schwächerer Ausprägung als durch Halothan wurde auch nach Bupivacain-Anästhesie eine Suppression der IgG-Antwort festgestellt. Es muß aber berücksichtigt werden, daß im Vergleich zu klinischen Anwendungen die Konzentration des Anästhetikums stark erhöht war. Angesichts der geringen Verminderungen scheint eine Anwendung in klinischen Konzentrationen, was die Einflüsse auf die humorale Immunantwort anlangt, keinen nennenswerten Effekt zu verursachen. Zuverlässige Aussagen über klinische Verwendung können hier selbstverständlich nicht gemacht werden. Durch die bekannt hohe Zytotoxizität (s. Kap. 4.2.6.3.) bedingte Einflüsse auf Zellen des Immunsystems können vor allem bei häufiger Anwendung nicht ausgeschlossen werden.

Verschiedene Angriffspunkte für den möglichen suppressiven Effekt von Halothan auf die IgG-Produktion können diskutiert werden. Diese sind innerhalb der bereits laufenden Immunantwort zu suchen, denn Beeinflussungen der Antigenerkennung sind durch den Nachweis einer normalen IgM-Antwort (s.o.) ausgeschlossen. Eine allgemeine Hemmung der Antikörperproduktion und/oder der Antikörpersekretion liegt nicht vor, da sonst auch eine Beeinflussung der IgM-Antwort stattfinden müßte.

Somit sind zwei mögliche Mechanismen zu diskutieren:

1) Möglicherweise wird durch Halothan eine Hemmung der T-Helfer-Zellen bewirkt. Dadurch könnte eine normale Kooperation von T-Helfer-Zellen und B-Lymphozyten behindert werden, so daß eine Reduktion in der Proliferation und Differenzierung antigenaktivierter B-Lymphozyten zu Plasmazellen eintreten würde. Für den Fall einer derartigen Störung wäre entweder ein ungünstiger Einfluß auf die Kooperation von T-Zelle und B-Zelle über eine Antigen-

brücke oder die Reduktion löslicher Faktoren aus der T-Helfer-Zelle, welche die Proliferation und Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen auslösen, möglich (s. Kap. 2.3.8.).
Dies könnte mit Ergebnissen von BRUCE (6) und CULLEN (7) in Einklang gebracht werden, die in vitro eine verminderte Proliferation mitogenstimulierter T-Lymphozyten nach Begasung mit Halothan nachweisen konnten.

2) Halothan könnte eine Störung des "switch" der Immunglobulinklassen von IgM zu IgG bewirken (s. Kap. 2.3.2.). Das würde bedeuten, daß Halothan gezielt diesen Umschaltvorgang der Plasmazelle hemmt, während die Antigenerkennung und die anfängliche IgM-Produktion ungestört ablaufen.

Der mögliche suppressive Einfluß des Halothans auf die IgG-Antwort fügt sich zu einer Reihe weiterer ungünstiger Nebenwirkungen des Halothans, vor allem Atemdepression, Blutdrucksenkung und Hepatotoxizität (s. Kap. 4.2.6.1.). Die Anästhesie durch Ketanest® zeigt hingegen keine dieser Nebenwirkungen. Ketanest® verursachte als einziges der verwendeten Anästhetika keinerlei Suppression der humoralen primären Immunantwort.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Der Einfluß von Halothan, Ketanest® und Bupivacain auf die humorale primäre Immunantwort von Balb/c-Mäusen bei gleichzeitiger Immunisierung wurde mittels des Jerne-Plaque-Tests, modifiziert nach CUNNINGHAM, untersucht. Erfaßt wurden die Immunglobulinklassen IgM und IgG.

Keines der drei verwendeten Anästhetika beeinflußte die Produktion von IgM. Die Bildung von IgG wurde durch Halothan und geringgradig auch durch Bupivacain supprimiert. Die Ergebnisse waren nicht statistisch signifikant. Im direkten Vergleich von Halothan und Ketanest® konnte eine deutliche Verminderung der IgG-produzierenden Plasmazellen nachgewiesen werden. Ketanest® verursachte keinen suppressiven Effekt auf die Produktion von Immunglobulin G.

8. LITERATURVERZEICHNIS

1 KOENIG, A., KOENIG, U.D., STOECKEL, H.: Anästhesie und Immunologie. Eine Übersicht, Prakt. Anästh. 13 (1978), 415-429

2 DUNCAN, P.G., CULLEN, B.F.: Anesthesia and Immunology - Review Article Anesthesiology, Vol. 45, No. 5 (Nov. 1976)

3 GRAHAM, E.A.: The influence of ether and ether anesthesia on bacteriolysis, agglutination and phagozytosis, J. Infect. Dis., 8: 147-175, 1911

4 CULLEN, B.F.: The effekt of halothane and nitrous oxide on phagozytosis and human leukocyte metabolism, Anesth. Analg. Curr. Res., 53: 531-536, 1974

5 LASSEN, H.C.A., HENRIKSEN, E., NEUKIRCH, F., KRISKENSEN, H.S.: Severe bone marrow depression after prolonged nitrous oxide anesthesia, Lancet, i, 527 (1956)

6 BRUCE, D.L.: Halothane inhibition of phytohemagglutinin - induced transformation of lymphocytes, Anesthesiology 36: 201 (1972)

7 CULLEN, B.F., SAMPLE, W.F., CHRETIEN, P.B.: The effect of halothane on phytohemagglutinin - induced transformation of human lymphocytes in vitro, Anesthesiology 26: 206 (1972)

8 NUNN, F., DIXON, K.L., LOVIS, J.D.: The effects of halothane on mitosis, Anesthesiology, 20, 348 (1969)

9 NUNN, F., LOVIS, J.D., KIMBALL, K.L.: Arrest of mitosis by halothane, British Journal of Anesthesia, 43, 524 (1971)

10 CULLEN, B.F.: Ketamine and in vitro Lymphocyte Transformation, Anesthesia and Analgesia, Curr. Res., Vol. 52, No. 4 (1973)

11 STURROCK, J.E., NUNN, J.F.: Cytotoxic effects of Procaine, Lignocaine and Bupivacaine, British Journal of Anesthesia 51: 273-281 (1979)

12 STURROCK, J.E., NUNN, J.F.: Mitosis in Mammalian Cells during Exposure to Anesthetics, Anesthesiology, Vol. 43: 21-33 (1975)

13 LÖFSTRÖM, B., SCHILDT, B.: Reticuloendothelial function under general anesthesia, acta anesth. scand. 18: 34-40 (1974)

14 ESPANOL, T., TODD, G.B., SOOTHILL, J.F.: The effect of anesthesia on the Lymphocyte response to phytohemagglutinin Clinical and Experimental Immunology, 13 (1973)

15 CULLEN, B.F., VAN BELLE, G.: Lymphocyte Transformation and Changes in Leukocyte Count, Anesthesiology, Vol. 43: 563-569 (1975)

16 OYAMA, T.: Endocrine responses to anesthetic agents, Br. J. Anesth. 45: 276-281 (1973)

17 OYAMA, T.: Effects of halothane anesthesia and surgery on adrenocorticol function in man, Canadian Anesthesist's Society Journal, 15, 258 (1968)

18 THOREN, L.: General metabolic response to trauma including pain influence, Acta Anesthiol. Scand. Suppl. 55: 9-14 (1974)

19 BUCHER, O.: Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen, 10. Auflage 1980, Verlag Hans Huber, Bern

20 LEONHARDT, H.: Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen, 4. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart (1974)

21 WALTON, B.: Anesthesia, Surgery and Immunology, review article, Anesthesia, Vol. 33: 322-348 (1978)

22 JUNGERMANN, K., MÖHLER, H.: Biochemie, 1. Auflage 1980, Springer-Verlag, Berlin

23 WIESMANN, E.: Medizinische Mikrobiologie, 4. Auflage 1978, Thieme-Verlag, Stuttgart

24 WOOD, L.E., WEISSMAN, J.L. WOOD, W.B.: Immunology, 1. Auflage 1978, The Benjamin/Cumarings Publishing Compl. Inc., Mealo Park, California

25 DAVIES, DULBECCO, EISEN, GINSBERG, WOOD: Principles of Microbiology and Immunology, Harper and Row, New York 1970

26 LINDEMANN, J.: Immunologie, 2. Auflage 1979, Thieme Verlag, Stuttgart

27 WABL, M.R., FORNI, L., LOOR, F.: Switch in Immunoglobulin Class Production Observed in Single Clones of Comitted Lymphocytes, Science, Vol. 199, 1078-1080 (1978)

28 TÖNNESMANN, E.: Zur Bedeutung des Immunstatus, Laboratoriumsblätter 28: 1-7 (1978)

29 JERNE, N.K., NORDIN, A.A.: Plaque formation in agar by single antibody producing cell, Science 140: 405-406 (1963)

30 JERNE, N.K., HENRY, C., NORDIN, A.A., FUYI, H., KOROS, A.M.C., LEVKOVITS, J.: Plaque forming cells: methodology and theory, Transplant. Rev. 18: 130-191 (1974)

31 DAVIES, DULBECCO, EISEN, GINSBERG: Microbiology, Harper and Row, New York 1980

32 BIER, GÖKE, MOTA, DIAS DA SILVA: Experimentelle und klinische Immunologie, Springer Verlag, Berlin 1979

33 BAUR, K.F. et al.: Unveröffentlichte Ergebnisse, z.Zt. in Druck

34 CUNNINGHAM, A.J.: Antibody formation by single cells from lymph nodes and efferent lymph of sheep, J. Exp. Med. 124: 701-714 (1966)

35 FRIEMEL: Immunologische Arbeitsmethoden, Fischer Verlag, Stuttgart 1980

36 DUDZIAK: Lehrbuch der Anästhesiologie, Schattauer Verlag, Stuttgart - New York 1980

37 FORTH, HENSCHLER, RUMMEL: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 3. Auflage 1980, B.J. Wissenschaftsverlag, Mannheim

38 KUEMMERLE, GARRETT, SPITZY: Klinische Pharmakologie und Pharmakotherapie, 3. Auflage 1976, Urban und Schwarzenberg Verlag

39 CAVALLI-STORZA, L.: Biometrie - Grundzüge biologisch medizinischer Statistik, 4. Auflage 1974, Fischer Verlag, Stuttgart

40 DRESSER, D.W., GREAVES, M.F.: Assays for antibody - producing cells, handbook of exp. immunology, Chapter 27, edited by D.M. Weir, Backwell

41 SELL, S., PARK, A.B., NORDIN, A.A.: Immunglobulin Classes of Antibody - forming Cells in Mice, The Journal of Immunology 104: 483 ff (1970)

LEBENSLAUF

Ich, Wilfried Frey, bin am 2.4.1956 in Öschingen als Sohn des Günther Frey, Kaufmann, und seiner Frau Lisbeth Frey, geb. Rueß, geboren.
Von 1963 bis 1966 besuchte ich die Grundschule in Tuttlingen, von 1967 bis 1975 das dortige Gymnasium.
Nach meinem Abitur im Mai 1975 begann ich im Wintersemester 1975/76 das Studium der Zahnheilkunde an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen. Im März 1978 legte ich dort die ärztliche Vorprüfung ab, im Dezember 1980 das Staatsexamen. Von Dezember 1978 bis zum Juni 1979 führte ich den experimentellen Teil der vorliegenden Arbeit am Institut für Anaesthesiologie der Universität Tübingen durch.